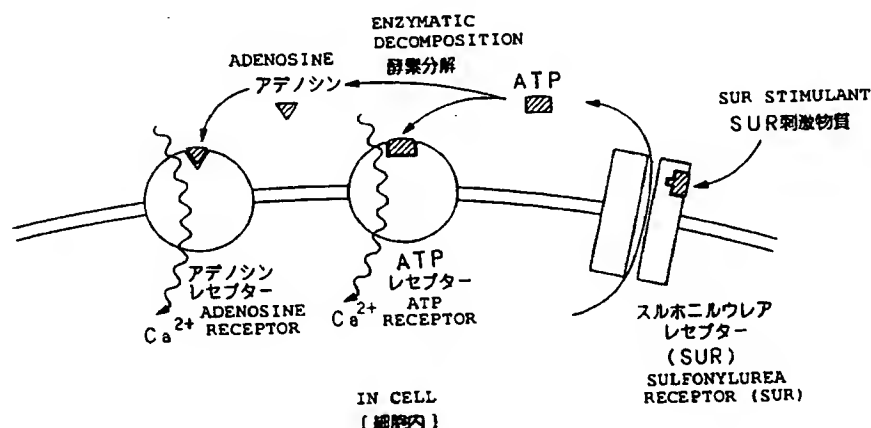




(51) 国際特許分類7 A61K 7/06, G01N 33/50, C12Q 1/02 // A61K 45/00	A1	(11) 国際公開番号 WO00/47172 (43) 国際公開日 2000年8月17日(17.08.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00694 (22) 国際出願日 2000年2月9日(09.02.00) (30) 優先権データ 特願平11/33502 1999年2月10日(10.02.99) JP 特願平11/33503 1999年2月10日(10.02.99) JP 特願平11/33504 1999年2月10日(10.02.99) JP 特願平11/33505 1999年2月10日(10.02.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大正製薬株式会社 (TAISHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒170-8633 東京都豊島区高田3丁目24番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 中屋 豊(NAKAYA, Yutaka)[JP/JP] 〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町3丁目18番15号 徳島大学医学部特殊栄養学教室内 Tokushima, (JP) 荒瀬誠治(ARASE, Seiji)[JP/JP] 〒770-8503 徳島県徳島市蔵本町2丁目50番1号 徳島大学医学部皮膚科学教室内 Tokushima (JP)	今村康二(IMAMURA, Koji)[JP/JP] 〒170-8633 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 志賀正武, 外(SHIGA, Masatake et al.) 〒169-8925 東京都新宿区高田馬場三丁目23番3号 ORビル Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title: **HAIR GROWTH STIMULANTS AND METHOD FOR SCREENING SUBSTANCE HAVING HAIR GROWTH STIMULATING EFFECT**

(54) 発明の名称 育毛剤及び育毛作用を有する物質のスクリーニング方法



(57) Abstract

Excellent hair growth stimulants having novel function mechanisms different from the conventional hair growth stimulants and a method for screening the same. The above-described hair growth stimulants contain as the active ingredient compounds exerting an effect of stimulating purine receptors (adenosine receptor, ATP receptor, etc.), an effect of potentiating the above effect, and an effect of liberating compounds having an effect of stimulating purine receptors (adenosine, adenosine derivatives, adenosine metabolites, etc.) from cells. The above-described screening method comprises adding a test substance to cells which have been transformed with an ABC transporter gene and a purine derivative receptor gene and using the calcium influx at this point as an indication.

(57)要約

従来の育毛剤とは異なる新規な作用機構を有する、優れた育毛剤及びそのスクリーニング方法が提供される。

本発明の育毛剤は、アデノシン受容体及びA T P受容体等のプリン受容体刺激作用及び当該作用の増強作用、並びに、アデノシン、アデノシン誘導体又はアデノシン代謝物等のプリン受容体刺激作用を有する化合物を細胞から放出させる作用を奏する化合物を有効成分として含有する。

本発明のスクリーニング方法は、A B Cトランスポーター遺伝子とプリン誘導体に対する受容体遺伝子で形質転換させた細胞に対して被験物質を添加し、そのときの該細胞内へのカルシウム流入量を指標とする。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

育毛剤及び育毛作用を有する物質のスクリーニング方法

技術分野

本発明は、育毛剤に関し、特に各種の外用剤として使用可能であり、優れた有効性を示す新規な作用機構を有する育毛剤に関する。また、本発明は、育毛作用を有する物質のスクリーニング方法に関し、特に新規作用機構を有する育毛作用物質のスクリーニング方法に関する。

背景技術

これまで、ヒト特に男性型脱毛を治療または予防する試みにおいて、多くの薬剤の使用が提案されてきた。そのような薬剤としては、例えば、血管拡張剤、男性ホルモン受容体阻害剤、ステロイド-5 α -レダクターゼ阻害剤、ビタミン類、免疫抑制剤等が挙げられる。しかし、実際には、これらの薬剤の育毛剤としての有効性は十分満足できるものではないのが現状である。

また、これまで、ヒト特に男性型脱毛を治療または予防する試みにおいて、いくつかの育毛物質のスクリーニング方法が提案されてきた。例えば、マウス、ラット、ウサギ、モルモット等の小動物、特に適当な週齢のC3HマウスやC57BLマウス等の主として背部毛を剃り、試験物質を塗布して発毛の程度を観察する方法、マウスのヒゲ、ヒトの頭髮等を摘出し、得られた毛組織を器官培養し、試験物質を添加してその成長の程度を評価する方法、または毛組織をさらに細胞レベルにまで分画し、特に毛乳頭細胞または外毛根鞘細胞を個別にまたは共存培養した系に、試験物質を添加して増殖促進効果を試験する方法、適当な動物またはヒトでの血管拡張作用または血流促進効果を試験するもの等が試みられている。また、特に男性型脱毛においては、その発症に男性ホルモンが関与していることから、男性ホルモン受容体阻害試験や男性ホルモンであるテストステロンをジヒドロテストステロンに変換させる酵素であるステロイド-5 α -レダクターゼ阻害試験等も応用されてきた。

発明の開示

本発明の目的は、従来の育毛剤と比較して発毛効果に優れた育毛剤を提供することにある。

また、本発明の他の目的は、従来の育毛剤とは異なる新規な作用機構を有する、優れた育毛剤を提供するためのスクリーニング方法を提供することにある。

本発明の1つの形態は、プリン受容体刺激作用を有する化合物、生体に適用後にプリン受容体刺激作用を有する化合物を遊離する化合物、若しくは、プリン受容体刺激作用を有する化合物の当該作用を増強する化合物の1種又は2種以上を有効成分として含有する育毛剤である。

本発明において、「プリン受容体刺激作用」とは、プリン受容体を刺激して細胞に対して何らかの現象を発生させる作用を指し、通常は、そのような刺激はプリン受容体と、該プリン受容体に特異的に結合可能な物質との相互作用によってもたらされる。

また、本発明において「生体に適用後にプリン受容体刺激作用を有する化合物を遊離する化合物」とは、皮膚、粘膜又は体内組織等への塗布又は投与等の後にプリン受容体刺激作用を有する化合物を分離して放出する機能を有する化合物であり、通常は、プリン受容体刺激作用を有する化合物に何らかの化学修飾が施された化合物である。前記化学修飾の例としては、具体的には、エステル化、アミド化等の操作が挙げられる。

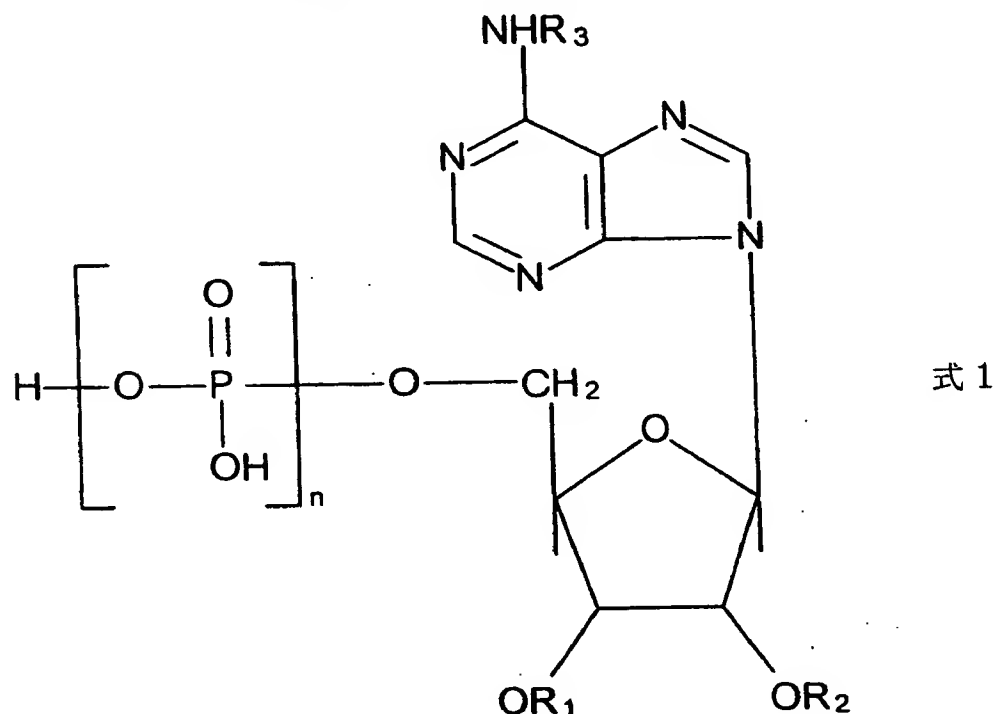
ところで、プリン受容体はP1及びP2受容体に大別されている。P1受容体はアデノシンに対する親和性が高いことからアデノシン受容体とも称呼されており、P2受容体はATPに対する親和性が高いことから同様にATP受容体とも称呼される。したがって、本発明のプリン受容体刺激作用を有する化合物にはアデノシン受容体及び／又はATP受容体の刺激作用を有する化合物が含まれる。

本発明のアデノシン受容体刺激を有する化合物としては、アデノシン、N6-シクロヘキシルアデノシン、N6-シクロベンチルアデノシン、(R)-N6-フェニルイソプロピルアデノシン、(S)-N6-フェニルイソプロピルアデノ

シン、(R)-フェニル-イソプロピルアデノシン、N-[R-(2-ベンゾチアゾリル)チオ-2-プロピル]-2-クロロアデノシン、2-クロロ-N6-シクロペンチルアデノシン、N-(メチル-フェネチル)アデノシン、ミノプリニル-デオキシ-N-エチルリボフラヌロアミド、デフィプロチド、5'-N-エチルカルボキサミドアデノシン、2-クロロアデノシン、N-エチル-1'-デオキシ-1'-[6-アミノ-2-[1-(3-ヒドロキシ-3-フェニル)プロピニル]-9H-プリン-9-イル]- β -D-リボフラン-5'-ウロナミド、N6-2-(4-アミノフェニル)エチルアデノシン、5'-N-シクロプロピルカルボキサミドアデノシン、N6-(p-スルホフェニル)アデノシン、1-デアザ-2-クロロ-N6-シクロペンチルアデノシン、8-ブチルアデノシン、1-シクロプロピルイソグアノシン、6-シクロヘキシル-2'-O-メチルアデノシン、2- β -D-リボフラノシルオキサゾール-4-カルボキサミド、2-ヨード-N6-シクロペンチルアデノシン、N6-シクロペンチル-2'-メチル-2-クロロアデノシン、N6-シクロヘキシル-2'-O-メチルアデノシン、2-[P-(2-カルボキシエチル)フェニルエチルアミノ]-5'-N-エチルカルボキサミドアデノシン、N6-[4-[[[4-[[[2-[[[(p-イソチオシアナトフェニル)アミノ]チオカルボニル]アミノ]エチル]アミノ]カルボニル]メチル]アミノカルボニル]メチル]フェニル]アデノシン、N6-[4-[[[4-[[[2-[[[(m-イソチオシアナトフェニル)アミノ]チオカルボニル]アミノ]エチル]アミノ]カルボニル]メチル]アミノカルボニル]メチル]フェニル]アデノシン、2-[(2-アミノエチルアミノ)カルボニルエチルフェニルエチルアミノ]-5'-エチルカルボキサミドアデノシン、2-ヘキシニル-5-メチルカルボキサミドアデノシン、2-シクロヘキシルメチリデンヒドラジノアデノシン、N-エチルカルボキサミドアデノシン、N6-[2-(3,5-ジメトキシフェニル)-2-(メチルフェニル)エチル]アデノシン、5'-(N-シクロプロピル)カルボキサミドアデノシン、N-[2-(3,5-ジメトキシフェニル)-2-フェニルエチル]アデノシン、N-(2-メチルベンジル)アデノシン、2-オクチニルアデノシン、2-フェニルアミノアデノシン、2-[2-(4-フルオロフェニル)エトキシ]アデノシン、2-[(シクロヘキシルメチレン)ヒドラジノ]ア

デノシン、2-クロロ-N6-(3-ヨードベンジル) アデノシン-5'-N-メチルウロナミド、N6-(3-イソチオシアナートベンジル) アデノシン-5'-N-メチルウロナミド、2-クロロ-N6-(3-ヨードベンジルアデノシン-5'-N-メチルカルボキサミド、ヒナシジル、デフィプロチド(短鎖デオキシリボヌクレオチド)、アデノシン-5'-モノリン酸、アデノシン-5'-モノリン酸メチルエステル、N6-メチルアデノシン-5'-モノリン酸、8-ブチルアミノアデノシン又はこれらの過ヨウ素酸酸化物が好ましい。

アデノシン受容体刺激作用を有する前記化合物又は生体に適用後にアデノシン受容体刺激作用を有する化合物を遊離する化合物は、下記式1：



[式中、nは0または1、R₁～R₂はそれぞれ水素原子または炭素原子数1～5のアシル基を示し、R₃は水素原子または保護基を示す。]で示される化合物であってもよい。

アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の当該作用を増強する前記化合物としては、アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の取り込み阻害剤が好ましい。ここで、「取り込み阻害剤」とは、対象となる化合物の細胞又は組織等への吸収、取り込みを阻害する作用を有する化合物を指す。前記取り込み阻害剤としては、

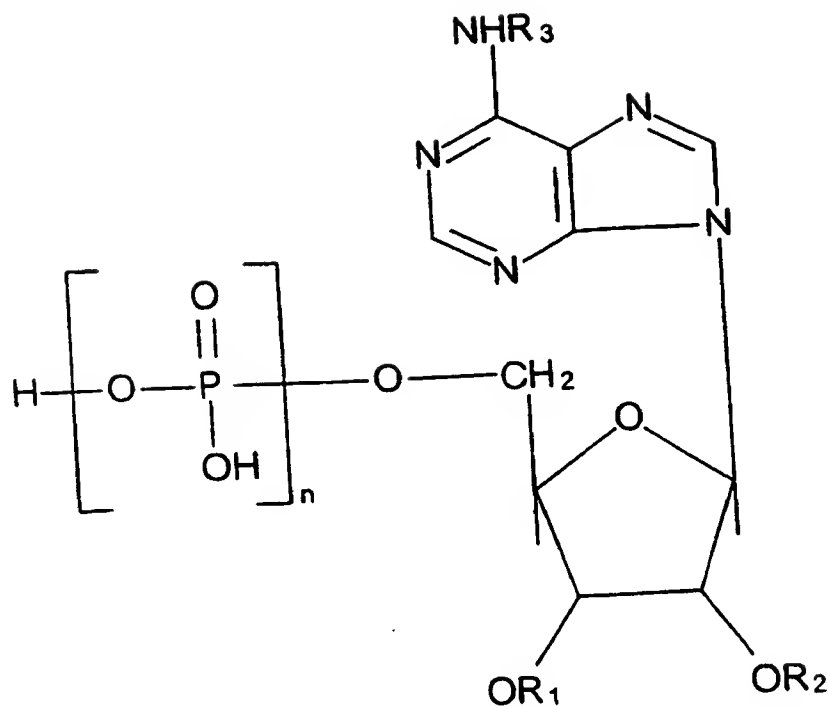
ジビリダモール、ジラセップ、リドフラジン、ヘキサベンジン、カルボクロメン、クロモナール酸、シネバジド、ジアゼパム、パパベリン、6-(2'-ヒドロキシニトロベンジル)チオグアノシン、プロベントフィリンが好ましい。

また、アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の当該作用を増強する化合物は、アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の不活性化阻害剤であってもよい。ここで、「不活性化阻害剤」とは、対象となる化合物のある特性、機能又は作用の減少を阻害する作用を有する化合物を指す。したがって、アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の不活性化阻害剤は、当該化合物のアデノシン受容体刺激作用の減少を妨げる機能を有する。アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の前記不活性化阻害剤としては、2'-デオキシコホルマイシン、エリスロー9-(2-ヒドロキシ-3-ノニル)アデニンが好ましい。

本発明の別の形態は、ATP受容体刺激作用を有する化合物の1種または2種以上を有効成分として含有する育毛剤である。

本発明のATP受容体刺激作用を有する化合物としては、例えば、アデノシンジリン酸、アデノシントリリン酸及びこれらの誘導体が挙げられるが、その中ではアデノシン-5'-ジリン酸、アデノシン-5'-トリリン酸及びこれらの誘導体が好ましい。なお、アデノシン-5'-ジリン酸の誘導体又はアデノシン-5'-トリリン酸の誘導体としては、エステル誘導体が好ましい。

前記アデノシン-5'-ジリン酸誘導体及び前記アデノシン-5'-トリリン酸誘導体は、下記式2：



[式中、 n は2または3、 $R_1 \sim R_2$ はそれぞれ水素原子または炭素原子数1～5のアシル基を示し、 R_3 は水素原子または保護基を示す。]で示される化合物であってもよい。

前記アデノシン-5'-ジリン酸誘導体としては、 α 、 β -メチレンアデノシン-5'-ジリン酸、2-メチルチオアデノシン-5'-ジリン酸、2'-ベンゾイルアデノシン-5'-ジリン酸、3'-ベンゾイルアデノシン-5'-ジリン酸が好ましい。

前記アデノシン-5'-トリリン酸誘導体としては、 α 、 β -メチレンアデノシン-5'-トリリン酸、2-メチルチオアデノシン-5'-トリリン酸、2'-ベンゾイルアデノシン-5'-トリリン酸、3'-ベンゾイルアデノシン-5'-トリリン酸が好ましい。

本発明の他の形態は、プリン受容体刺激作用を有する化合物を細胞から放出させる作用を有する化合物の1種又は2種以上を有効成分として含有する育毛剤である。プリン受容体刺激作用を有する化合物はアデノシン、アデノシン誘導体またはアデノシン代謝物であってもよく、また、ATP、ATP誘導体またはAT

P代謝物であってもよい。

細胞から放出されるアデノシン誘導体またはアデノシン代謝物は、アデノシンモノホスフェート、アデノシンジホスフェート、またはアデノシントリホスフェートでありうる。

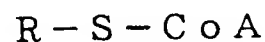
プリン受容体刺激作用を有する化合物、特に、アデノシン、アデノシン誘導体またはアデノシン代謝物、を細胞から放出させる作用を有する化合物は細胞に存在するABCトランスポーターへの刺激作用を有する化合物とすることができる。

ABCトランスポーターへの刺激作用を有する化合物は、スルホニルウレア受容体への刺激作用を有する化合物とすることができる。

スルホニルウレア受容体への刺激作用を有する化合物は、メグリチニド、ニコランジル、レボクロマカリム、クロマカリム、ピナシジル、ジアゾキサイド、ジソピラミド、チリソロール、アブリカム、ヒマカリム、MgATP、MnATP、CaATP、ZnATP、SrATP、MgADP、MnADP、CaADP、ZnADP、SrADP、MgAMP、MnAMP、CaAMP、ZnAMP、SrAMP、アデニル-5-イルイミドジホスフェート、L-リジン、L-アルギニンからなる群より選択される化合物であってよい。

スルホニルウレア受容体への刺激作用を有する化合物は、カルシウム、マンガン、マグネシウム、亜鉛、およびストロンチウムからなる群より選ばれる二価陽イオンを含む塩であってよい。

スルホニルウレア受容体への刺激作用を有する化合物は、下記式3：



式3

[式中、Rは分岐しても良い炭素数14～30のアシル基で、二重結合を0～3個含む]で示される長鎖アシルコエンザイムAであってよい。

上記の各化合物を有効成分として含有する本発明の育毛剤は、外用剤であることが好ましく、また、本発明の育毛剤において、当該有効成分の含有量は、製剤全体の0.01～5重量%であることが好ましい。

本発明の更なる他の形態は、A B Cトランスポーター遺伝子とプリン誘導体に対する受容体遺伝子で形質転換させた細胞に対して被験物質を添加し、そのときの細胞内へのカルシウム流入量を指標とすることを特徴とする、育毛作用を有する物質のスクリーニング方法である。

上記A B Cトランスポーター遺伝子は、スルホニルウレア受容体遺伝子とすることができる。

上記プリン誘導体に対する受容体遺伝子はアデノシン受容体遺伝子またはA T P受容体遺伝子とすることができる。

細胞内へのカルシウム流入量は蛍光カルシウム指示薬を用いた蛍光強度で測定することができる。

A B Cトランスポーター遺伝子またはプリン誘導体に対する受容体遺伝子の形質転換を、宿主ベクター系による遺伝子組み換え技術によって行うことができる。

図面の簡単な説明

図1 本発明の育毛剤及び本発明の方法によってスクリーニングされる物質の、作用機構を示す説明図である。

図2 本発明のスクリーニング方法の実施例の結果を示すグラフである。

図3 本発明のスクリーニング方法の実施例の結果を示すグラフである。

発明の詳細な説明

まず、本発明の育毛剤について記述する。

本発明者らは、優れた有効性を有する育毛成分について鋭意研究の結果、驚くべきことに、アデノシン受容体及びA T P受容体を含むプリン受容体への刺激作用が育毛効果と密接な関連を有していることを見出した。本発明は、この知見に基づくものであり、

A. プリン受容体刺激作用を有する化合物、生体に適用後にプリン受容体刺激作用を有する化合物を遊離する化合物、及び、プリン受容体刺激作用を有する化合物の当該作用を増強する化合物；及び

B. プリン受容体刺激作用を有する化合物を細胞から放出させる作用を有する化合物、例えば、ABCトランスポーター刺激作用を有する化合物、特にスルホニルウレア受容体刺激作用を有する化合物；
を育毛成分として使用することを特徴とする。

以下、上記A及びBのタイプの化合物をそれぞれ含む育毛剤（以下、各々、プリン受容体直接刺激型、及び、プリン受容体間接刺激型と称する）について詳細に説明を行う。

1. プリン受容体直接刺激型育毛剤

既述したように、プリン受容体はアデノシン受容体及びATP受容体に大別される。そこで、まずアデノシン受容体を特に刺激するタイプの化合物を含有する育毛剤について説明する。

アデノシン受容体は、薬理的及び構造的な特徴をもとに、現在、A1、A2a、A2b、A3の4種類のサブタイプに分類されている。そして、A1受容体は抗けいれん効果、神経保護効果、行動抑制効果、睡眠効果等を、A2（A2a又はA2b）受容体は行動抑制効果、睡眠効果等を、そしてA3受容体は肥満細胞の脱顆粒促進効果等の生理作用を有することが知られている。

アデノシン受容体は生体中において様々な臓器に分布しており、細胞機能及び生理機能の調節に関与しているものと考えられている。例えば、心臓の血管平滑筋に分布するアデノシン受容体は、血中のアデノシン受容体刺激作用を有する化合物との結合により、血管を拡張し、冠血管の血流量を増大させることが知られている。また、近年、細胞上に存在するアデノシン受容体の刺激が細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる等の現象を発生させることが明らかとなっている。

本発明者らは、アデノシン受容体刺激作用がもたらす様々な現象が細胞組織の他の機能の調節に重要な役割を有する可能性について様々な側面から研究を重ねた結果、アデノシン受容体刺激作用が毛髪の生育に関して深く関与していることを突き止め、この知見に基づき、高い育毛効果を有する新規な育毛剤を開発した。

すなわち、本発明の育毛剤の1つの形態は、アデノシン受容体刺激作用に基づ

くものである。

この育毛剤の有効成分としては、アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の1種又は2種以上の他に、生体に適用後にアデノシン受容体刺激作用を有する化合物を遊離する化合物、若しくは、アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の当該作用を増強する化合物の1種又は2種以上が挙げられる。これらの化合物は単独で使用されてもよく、また、複数の種類が混合されて使用されてもよい。

アデノシン受容体刺激作用を有する前記化合物は、アデノシン受容体を刺激する作用を有するものであれば特に限定されるものではないが、アデノシン受容体との結合性の点では、アデノシン、N6-シクロヘキシルアデノシン、N6-シクロペンチルアデノシン、(R)-N6-フェニルイソプロピルアデノシン、(S)-N6-フェニルイソプロピルアデノシン、(R)-フェニルイソプロピルアデノシン、N-[R-(2-ベンゾチアゾリル)チオ-2-プロピル]-2-クロロアデノシン、2-クロロ-N6-シクロペンチルアデノシン、N6-[4-[[[4-[[[2-[[[(p-イソチオシアナトフェニル) アミノ]チオカルボニル]アミノ]エチル]アミノ]カルボニル]メチル]アミノカルボニル]メチル]フェニル]アデノシン、N6-[4-[[[4-[[[2-[[[(m-イソチオシアナトフェニル) アミノ]チオカルボニル]アミノ]エチル]アミノ]カルボニル]メチル]アミノカルボニル]メチル]フェニル]アデノシン、N-(メチルフェネチル)アデノシン、ミノプリニル-デオキシ-N-エチルリボフラヌロアミド、5'-N-エチルカルボキサミドアデノシン、2-クロロアデノシン、N-エチル-1'-デオキシ-1'-[6-アミノ-2-[1-(3-ヒドロキシ-3-フェニル)プロピニル]-9H-プリン-9-イル]-β-D-リボフラン-5'-ウロナミド、N6-2-(4-アミノフェニル)エチルアデノシン、5'-N-シクロプロピルカルボキサミドアデノシン、N6-(p-スルホフェニル)アデノシン、1-デアザ-2-クロロ-N6-シクロペンチルアデノシン、8-ブチルアデノシン、1-シクロプロピルイソグアノシン、6-シクロヘキシル-2'-O-メチルアデノシン、2-β-D-リボフラノシルオキサゾール-4-カルボキサミド、2-ヨード-N6-シクロペンチルアデノシン、N6-シクロペンチル-2'-メチル-2-クロロアデノシン、N6-シクロヘキシル-2'-O-メチルアデノシン

ン、2-[P-(2-カルボキシエチル)フェニルエチルアミノ]-5'-N-エチルカルボキサミドアデノシン、2-[(2-アミノエチルアミノ)カルボニルエチルフェニルエチルアミノ]-5'-エチルカルボキサミドアデノシン、2-ヘキシニル-5-メチルカルボキサミドアデノシン、2-シクロヘキシルメチリデンヒドラジノアデノシン、N-エチルカルボキサミドアデノシン、5'-(N-シクロプロピル)カルボキサミドアデノシン、N-[2-(3,5-ジメトキシフェニル)フェニルエチル]アデノシン、N-(2-メチルベンジル)アデノシン、2-オクチニルアデノシン、2-フェニルアミノアデノシン、2-[2-(4-フルオロフェニル)エトキシ]アデノシン、2-[(シクロヘキシルメチレン)ヒドラジノ]アデノシン、2-クロロ-N6-(3-ヨードベンジル)アデノシン-5'-N-メチルウロナミド、N6-(3-イソチオシアナートベンジル)アデノシン-5'-N-メチルウロナミド、2-クロロ-N6-(3-ヨードベンジル)アデノシン-5'-N-メチルカルボキサミド、デフィブロチド(短鎖デオキシリボヌクレオチド)、ピナシジル、アデノシン-5'-モノリン酸、アデノシン-5'-モノリン酸メチルエステル、N6-メチルアデノシン-5'-モノリン酸、8-ブチルアミノアデノシン又はこれらの過ヨウ素酸酸化物が好ましく、また、育毛効果の面では、A1及びA2タイプのアデノシン受容体への刺激作用が高い化合物がより好ましい。

また、育毛効果の点では、アデノシン受容体刺激作用を有する前記化合物又は生体に適用後にアデノシン受容体刺激作用を有する化合物を遊離する前記化合物は、上記式1に示される構造を有する化合物であることが好ましく、その場合は、 $R_1 \sim R_2$ はそれぞれ水素原子又は炭素原子数1~5のアシル基、 R_3 は水素原子又は保護基とされることが好ましい。

ところで、アデノシンをはじめとするアデノシン受容体刺激作用を有する化合物は、生体の様々な組織においてその生成と代謝が行われている。したがって、アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の当該作用を増強する化合物にも、アデノシン受容体刺激作用を有する化合物と同様の効果が存在する。本発明の育毛剤に配合されるアデノシン受容体刺激作用を有する化合物の当該作用を増強する化合物としては、具体的には、アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の取り

込み阻害剤及び不活性化阻害剤が好ましい。なお、前記不活性化剤としては、アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の酵素による代謝を阻害する化合物を挙げることができ、例えば、アデノシンを生体内で不活性なイノシンに代謝するアデノシンデアミナーゼの阻害剤を使用してもよい。

前記取り込み阻害剤としては、取り込み阻害効果の点で、ガジビリダモール、ジラセップ、リドフラジン、ヘキソベンジン、カルボクロメン、クロモナール酸、シネバジド、ジアゼパム、パバベリン、6-(2'-ハイドロキシニトロベンジル)チオグアノシン、プロベントフィリンが好ましく、また、前記不活性化阻害剤としては、その効果の点で、2'-デオキシコホルマイシン、エリスロー9-(2-ハイドロキシ-3-ニル)アデニンが好ましい。

次に、ATP受容体を特に刺激するタイプの化合物を含有する育毛剤について説明する。

ATP受容体には、リガンドの刺激を細胞内に伝達する方法としてイオンの細胞膜透過を利用するものとGTP結合蛋白を介するものの2種類があるとされており、P2X型及びP2Y型（それぞれ7つのサブタイプを有する）と称呼されている。

ATP受容体は生体中では様々な臓器に分布しており、情報伝達や機能調節に関与しているものと考えられている。例えば、神経系ではシナプス変調作用、大動脈では血圧調節を担っているものと考えられている。しかし、いまだその分布の詳細や機能については明確にされていないのが現状である。アデノシン及びATP（アデノシントリリン酸）はいずれもプリン環を有することから、プリン受容体の概念には、アデノシン受容体及びATP（アデノシントリリン酸）受容体が含まれる。

ところで、近年、細胞上に存在するATP受容体の刺激が細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇を引き起こすこと等が明らかとなってきた。本発明者らは、ATP受容体刺激作用が細胞組織の他の機能の調節に重要な役割を有する可能性について、様々な側面から研究を重ねた結果、ATP受容体刺激作用が毛髪の生育に関して深く関与していることを突き止め、この知見に基づき、高い育毛効果

を有する新規な育毛剤を開発した。

すなわち、本発明の育毛剤の他の形態は、アデノシン受容体以外のプリン受容体、すなわちA T P受容体への刺激作用に基づくものである。

このタイプの育毛剤の有効成分としては、A T P受容体刺激作用を有する化合物の1種又は2種以上が挙げられる。これらの化合物は単独で使用されてもよく、また、複数の種類が混合されて使用されてもよい。

この育毛剤の有効成分は、A T P受容体刺激作用を有するものであれば特に限定されるものではないが、例えば、アデノシンジリン酸、アデノシントリリン酸又はそれらの誘導体を挙げることができる。生体における機能の点では、前記アデノシンジリン酸及び前記アデノシントリリン酸において、リン酸部分の結合位は、5'位の炭素が好ましい。したがって、上記した例の中では、アデノシンー5'-ジリン酸、アデノシンー5'-トリリン酸及びこれらの誘導体が好ましい。

また、育毛効果の面では、アデノシンー5'-ジリン酸の誘導体又はアデノシンー5'-トリリン酸の誘導体としてエステル誘導体が好ましい。なお、エステル誘導体としては、アデノシン部位の2'又は3'位の炭素に結合した酸素原子が、1~10、好適には1~5の炭素原子を含むアシル基と共にエステルを形成していることが好ましい。

アデノシンー5'-ジリン酸の誘導体及びアデノシンー5'-トリリン酸の誘導体は、具体的には、上記式2に示される化合物であってもよく、その場合は、 R_1 ~ R_2 はそれぞれ水素原子又は炭素原子数1~5のアシル基、 R_3 は水素原子または適当な保護基とされることが好ましい。

なお、育毛効果の点では、前記アデノシンー5'-ジリン酸誘導体は、 α 、 β -メチレンアデノシンー5'-ジリン酸エステル誘導体、2-メチルチオアデノシンー5'-ジリン酸エステル誘導体、2'-ベンゾイルアデノシンー5'-ジリン酸エステル誘導体、又は、3'-ベンゾイルアデノシンー5'-ジリン酸エステル誘導体であることが好ましい。

同様に、育毛効果の点では、前記アデノシンー5'-トリリン酸エステル誘導体は、 α 、 β -メチレンアデノシンー5'-トリリン酸エステル、2-メチルチオアデノシンー5'-トリリン酸、2'-ベンゾイルアデノシンー5'-トリリ

ン酸、又は、3'-ベンゾイルアデノシン-5'-トリリン酸であってもよい。

2. プリン受容体間接刺激型育毛剤

A B Cトランスポーターは、細胞内のA T Pの細胞外への放出を引き起こす作用を有する類似タンパクの総称であり、タンパクとしては、いわゆるA B Cタンパクスーパーファミリーを構成する一部で、A T Pバインディングカセット、A T P結合タンパク、A B C結合トランスポーターまたはA B Cタンパクとも呼ばれており、M D R (P糖タンパク質、multidrug resistance protein)、M R P (MDR-related protein)、C F T R (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)、S U R (スルホニルウレア受容体)などが挙げられ、様々な細胞機能の発現やその調節に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。

例えば膵臓のベータ細胞膜に存在するA B Cトランスポーターは、隣接するA T P依存性カリウムチャンネルの開閉をコントロールしてカリウムイオンの細胞外への放出とその後のカルシウムイオンの流入を調節し、細胞小胞内のインスリンの細胞外への分泌をコントロールしている。さらに、心筋のA B Cトランスポーターはミトコンドリアに存在し、同じくミトコンドリアに存在するA T P感受性カリウムチャンネルの機能を調節し、虚血再灌流時のプレコンディショニング効果(心筋保護効果)の発現に関与していることが明らかとなってきた。一方、A B Cトランスポーターは心筋や血管平滑筋をはじめとして、生体の様々な組織に存在していることが知られるようになってきており、トランスポーターとしての役割、即ち細胞内のA T Pの細胞外への放出を引き起こす作用も様々な調節作用に関与していることが推察されている。また、膵臓の β 細胞、血管平滑筋及び心筋に存在するA B Cトランスポーターはスルホニルウレア受容体であることが明らかになっている。

スルホニルウレア受容体は、A T P感受性カリウムチャンネルの制御因子として機能することが知られている(稲垣ら、「スルホニル尿素受容体」(生化学第69巻第9号1067頁、1997年))。

本発明者らは、毛乳頭細胞にA B CトランスポーターとA T P受容体またはア

デノシン受容体が発現していることを見出した。そして、これらの受容体、すなわちプリン受容体の刺激作用を有する化合物を細胞から放出させる作用を有する化合物、特にA B Cトランスポーターを刺激することによりその作用を発揮する化合物が、従来の育毛成分には見られなかった優れた有効性を示すことを見出した。プリン受容体刺激作用を有する化合物には、A T P受容体及び／又はアデノシン受容体刺激作用を有する化合物が含まれ、具体的には、A T P、A T P誘導体又はA T P代謝物、及び／又は、アデノシン、アデノシン誘導体又はアデノシン代謝物が挙げられる。

プリン受容体刺激作用を有する化合物を細胞から放出させる作用と育毛効果との関連性について、本発明者らは、図1に示すように、例えばスルホニルウレア受容体などのA B Cトランスポーターを刺激することにより、アデノシントリリン酸（A T P）が細胞内から放出され、これがA T P受容体に作用するか、またはA T Pが分解して生成したアデノシンがアデノシン受容体に作用し、細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こし、毛成長速度や毛周期を調節する機構を司っているものと考えている。または、ミトコンドリアに存在するスルホニルウレア受容体の刺激がミトコンドリアに存在するA T P感受性カリウムチャンネルに作用し、これがA T P、アデノシン、それらの誘導体又は代謝物を細胞から放出させることも考えられる。

したがって、本発明の育毛剤の更なる他の形態は、プリン受容体刺激作用を有する化合物を細胞から放出させる作用に基づくものである。具体的には、この育毛剤の有効成分としては、A T P、アデノシン、それらの誘導体または代謝物を細胞から放出させる作用を有する化合物の1種又は2種以上が挙げられる。これらの化合物は単独で使用されてもよく、また、複数の種類が混合されて使用されてもよい。

プリン受容体刺激作用を有する化合物、例えばアデノシンおよびその誘導体または代謝物、を細胞から放出させる作用の具体例としては、例えば当該細胞に存在するA B Cトランスポーターを刺激することがあげられる。

本発明において、アデノシンおよびその誘導体または代謝物としては、アデノシン、アデノシンモノホスフェート、アデノシンジホスフェートおよびアデノシ

ントリホスフェートなどが挙げられる。

A B C トランスポーターへの刺激作用を有する化合物としては、MDR、MRP、CFTR、スルホニルウレア受容体のいずれかへの刺激作用を有する化合物を用いることができるが、好ましくはスルホニルウレア受容体を刺激作用を有する化合物が挙げられる。

スルホニルウレア受容体を刺激作用を有する化合物としては、例えば、メグリチニド、ニコランジル、レボクロマカリム、クロマカリム、ピナシジル、ジアゾキサイド、ジソピラミド、チリソロール、アプリカム、ピマカリム、MgATP、MnATP、CaATP、ZnATP、SrATP、MgADP、MnADP、CaADP、ZnADP、SrADP、MgAMP、MnAMP、CaAMP、ZnAMP、SrAMP、アデニル-5-イルイミドジホスフェート、L-リジン、L-アルギニン、カルシウム、マンガン、マグネシウム、亜鉛またはストロンチウムの二価陽イオンを含む塩、および下記式



[式中、Rは分岐しても良い炭素数14～30のアシル基で、二重結合を0～3個含む]で示される長鎖アシルコエンザイムA、その中でも特にオレオイル-CoA、パルミトイル-CoA、オレイル-CoA、ミリストイル-CoA、ペンタデカノイル-CoA、ステアリル-CoAが挙げられる。

これらの物質は、カリウムチャネルの開口剤として知られている（例えば、高橋ら、「Kチャネル開口薬」、医薬ジャーナル、vol.34, S-1, P.70-74 (1998)、および遠藤ら、「カリウムチャネル開口薬」、医薬ジャーナル、vol.35, S-1, P.112-119 (1999)参照）。スルホニルウレア受容体は、ATP感受性カリウムチャネルの制御因子として機能しており、カリウムチャネルの開口剤が、スルホニルウレア受容体に結合することはすでに知られている（例えば、Brayら、Journal of Biological Chemistry, vol.267, p.11689 (1992)参照）。そして、スルホニルウレア受容体が、細胞内より細胞外へATPの放出に関与していることもすでに提唱されている（Awqatiら、Science vol.269, 805 (1995)参照）。

したがって、カリウムチャネルの開口剤として知られている上記物質は、スルホニルウレア受容体に結合して、これを刺激するものと考えられる。本発明は、これらの物質のスルホニルウレア受容体への結合によるスルホニルウレア刺激作用、すなわちABCトランスポーターへの刺激作用が、ATP、アデノシン、それらの誘導体または代謝物等のプリン受容体刺激作用を有する化合物を細胞から放出させ、育毛効果を発揮させることに初めて着目したものである。

本発明の育毛剤は、外用剤であることが好ましく、1日1～数回、適量を頭皮、皮膚上に塗布して使用することができる。また、本発明の育毛剤に含有される各有効成分の配合量は、好ましくは製剤全体中0.01～5重量%であり、より好ましくは0.1～5重量%、特に好ましくは1～5重量%である。この配合量が0.01重量%未満であると、育毛効果が十分でなく、5重量%を超えると、有効成分の製剤中での溶解安定性が低下することが多く、例えば低温保存時に結晶析出が認められるなど品質への悪影響が懸念されるため好ましくない。

本発明の育毛剤は、外用剤として通常用いられる剤形、例えばローション剤、乳剤、クリーム剤、トニック剤、軟膏剤、ゲル剤、エアゾール剤等として使用することができるが、外用剤として使用される剤形であればこれらに限定されるものではない。なお、エアゾール剤として使用する場合は、原液に対して上記のように配合量が設定される。

なお、本発明の育毛剤には、それぞれ、必要に応じ水、低級アルコール（メタノール、エタノール、変性エタノール、イソプロピルアルコール等）、溶解補助剤、界面活性剤、乳化安定剤、ゲル化剤、粘着剤、その他、所望する剤型を得るために通常使用される基剤成分を配合でき、使用目的に応じて、ミノキシジル、塩化カルプロニウム等の血管拡張剤、スピロノラクトン、フルタミド、シプロテロンアセテート、オキシンドロン等の男性ホルモン受容体阻害剤、フィナステライド、エピリスステライド等のステロイド5 α -レダクターゼ阻害剤、グリチルレチン酸、アズレン等の抗炎症剤、酢酸ヒドロコルチゾン、酢酸デキサメサゾン等の副腎皮質ホルモン、尿素、サリチル酸等の角質溶解剤、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、マクロゴール、グリセリン、ジプロピレングリコ

ール、エタノール、イソプロパノール等のアルコール類、グリセリルモノペンタデカノエート等の脂肪酸グリセリンエステル、塩酸イソベンジル、塩酸ジフェンヒドラミン等の抗ヒスタミン剤、グルコン酸クロルヘキシジン、イソプロピルベチルフェノール、第4級アンモニウム塩、ヒノキチオール、ピロクトンオラミン等の殺菌剤、ヒアルロン酸ナトリウム、グリセリン、コンドロイチン硫酸等の保湿剤、イチイ、ボタンビ、カンゾウ、オトギリソウ、附子、ビワ、カワラヨモギ、コンフリー、アシタバ、サフラン、サンシン、ローズマリー、セージ、モッコウ、セイモッコウ、ホップ、ブラセンタなどの動植物の抽出物、酢酸レチノール、塩酸ピリドキシン、アスコルビン酸、硝酸チアミン、シアノコバラミン、ビオチン、酢酸トコフェノール等のビタミン類、ミリスチン酸イソプロピル、パルチミン酸イソプロピル、スクワラン、流動パラフィン、レシチン等の油分、ポリエキシエチレンソルビダン脂肪酸エステル、ソルビダン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ポリエキシエチレン硬化ヒマシ油などの界面活性剤、ジブチルヒドロキシトルエン、イソプロピルガレート等の抗酸化剤、エチレンジアミンテトラアセテート等のキレート剤、メントール、カンフル等の清涼化剤、色素、香料、経皮吸収促進剤等の成分を本発明の効果を損なわない範囲で配合することができる。

また、適用対象又は必要とされる育毛効果の程度等にも依存するが、必要であれば、本発明の育毛剤は、上記A及びBのタイプの化合物の両方を含んでもよい。

次に、本発明の育毛物質のスクリーニング方法について記述する。

図1に関連して既に説明したとおり、毛乳頭細胞にはABCトランスポーターとATP受容体又はアデノシン受容体が発現しており、これらは相互に密接に関連して育毛作用を示すものと思われる。特に、ABCトランスポーターに対する刺激作用を有する化合物については、このABCトランスポーターに対する刺激作用を介するATP受容体またはアデノシン受容体の刺激により、細胞内カルシウム濃度の上昇を伴って育毛効果を示すのではないかと考えられる。

そこで、毛乳頭細胞を用いて育毛剤のスクリーニングを実施したが、目的とす

る毛乳頭細胞は、増殖能が極めて悪く、スクリーニングに必要な細胞数を確保するには多量の毛組織が必要で、その実施には多大な労力と費用を要した。そのため、ABCトランスポーターを介してATP受容体またはアデノシン受容体に作用して効果を示す物質を見出す簡便な方法の開発が望まれた。

そこで、本発明者らは鋭意研究の結果、ABCトランスポーター遺伝子と、ATP受容体遺伝子またはアデノシン受容体遺伝子を適当な宿主ベクター法による遺伝子組み替え技術によって遺伝子組み替え細胞とし、この細胞へのカルシウムの流入を測定することにより育毛物質をスクリーニングする方法を確立し、本発明を完成させた。

即ち、本発明の育毛物質のスクリーニング方法は、ABCトランスポーター遺伝子およびプリン誘導体に対する受容体遺伝子を宿主ベクター法によって発現させた細胞を使用し、細胞内へのカルシウムの流入を指標とすることを特徴とする。

上記したとおり、ABCトランスポーターは、細胞内のATPの細胞外への放出を引き起こす作用を有する類似タンパクの総称であり、タンパクとしては、いわゆるABCタンパクスーパーファミリーを構成する一部で、ATPバインディングカセット、ATP結合タンパク、ABC結合トランスポーターまたはABCタンパクとも呼ばれている。ABCトランスポーターとしては、例えば、MDR (P糖タンパク質、multidrug resistance protein)、MRP (MDR-related protein)、CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)、SUR (スルホニルウレア受容体) などが挙げられる。中でも、本発明に用いられるATP結合トランスポーター遺伝子としては特にスルホニルウレア受容体遺伝子 (以下SUR遺伝子ともいう) が好ましい。

スルホニル受容体遺伝子は、すでに知られているSUR遺伝子配列の情報、例えばY.Tokuyamaら、Biochemical and Biophysical Research Communications, 220, p.532-538 (1996)に記載されたハムスターSUR遺伝子配列の情報を元に該配列から作成した適当なプローブを用いて、周知のPCR法やcDNAライブラリーからのハイブリダイゼーション法などにより得られることができる。また、ラットのSURcDNA配列も知られている (GenBank Accession No.L40624)。ハムスターSUR遺伝子導入に関しては、Aguilar-Bryanら、Science, vol.268, p.423 (1995)に記載されて

いる。ラット、マウスSURのアミノ酸配列については、稲垣ら、「スルホニル尿素受容体」（生化学第69巻、第9号、1067頁、1997年）に記載されている。

上記アデノシン誘導体に対する受容体遺伝子としては、プリン受容体遺伝子またはアデノシン受容体遺伝子が挙げられる。

アデノシン受容体遺伝子としては、すでにヒトのcDNA遺伝子配列が知られている（GenBank Accession No.X68485）。あるいはスルホニル受容体遺伝子と同様に、周知のPCR法またはcDNAライブラリーからのハイブリダイゼーション法などにより得られることができる。

ATP受容体遺伝子についても、ヒトのcDNA遺伝子配列が知られている（GenBank Accession No.X83688）。

これらの遺伝子の種に関しては特に制限はなく、例えば、ヒト、ラット、マウス、ハムスター由来のものが挙げられる。

これらの遺伝子をクローン化する方法としては、例えば、Sambrookら、Molecular Biology: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York 1989等に記載された一般的な方法を用いることができる。

上記ABCトランスポーター遺伝子またはプリン誘導体に対する受容体遺伝子としては、形質転換後に形質転換細胞内でABCトランスポーターまたはプリン誘導体に対する受容体として機能する範囲で、遺伝子配列の内部または末端の一部が、挿入、置換あるいは削除されたものも含む。

また、本発明に用いられる宿主としては導入した遺伝子が効率よく発現され、培養が容易なものであれば特に限定されないが、エシェリヒア属菌である*Escherichia coli*の各種菌株、バチルス属菌種である*Bacillus subtilis*の各種菌株、酵母としては*Saccharomyces cerevisiae*の各種菌株、動物細胞としてはCOS-7細胞、CHO細胞、PC12細胞、NIH3T3細胞、NRK細胞、CV-1細胞、COS-1細胞等が好ましい。

ベクターとしては、調製が容易で効率よく導入できるものであれば特に限定されないが、大腸菌由来のプラスミド（例：pBR322、pUC118など）、枯草菌由来のプラスミド（例：pUB110、pC194など）、酵母由来のプラスミド（例：pSH19など）、さらにバクテリオファージやレトロウイルスや

ワクシニアウイルス等の動物ウイルス等が好ましい。さらに、該当遺伝子を発現させるために、遺伝子上流に適当な発現プロモーターを接続する。使用するプロモーターは、宿主に応じて選択すればよい。例えば、宿主が大腸菌である場合には、T7プロモーター、lacプロモーター、trpプロモーター、 γ PLプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合にはSPO系プロモーター等が、宿主が酵母である場合にはPHOプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター等が、宿主が動物細胞である場合にはSV40由来プロモーター、レトロウイルスプロモーター等が、それぞれ使用できる。

形質転換は、DNAが、染色体外要素として、あるいは染色体組み込みによりDNAが複製可能となるように、DNAを生体内に導入することを意味する。

上記組み替えベクターを用いて宿主細胞を形質転換する方法としては、各宿主細胞に対して一般に用いられる形質転換方法、例えば塩化カルシウムを使用するカルシウム処理、リン酸カルシウム法によるトランスフェクション、エレクトロポレーション、またはリポフェクションなどが適用できる (Sambrookら, Molecular Biology: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York 1989など)。

こうして得られた形質転換細胞を適当な選択培地で培養してスクリーニングに供する。このスクリーニングのための培養は、細胞をカバーグラス上で培養して供することが好ましい。例えば、形質転換細胞を細胞濃度 $3 \times 10^7/\text{mL}$ となるように培地に懸濁し、適量をカバーグラス上に載せ、24~48時間程度、約37°Cで培養する。

スクリーニングの方法としては、培養細胞に、被験物質溶液を添加し、細胞内へのカルシウムの流入量を測定することにより行う。

細胞内カルシウム濃度測定法としては、カルシウムキレート剤でありカルシウム結合量に応じてその蛍光特性が変化する周知の蛍光カルシウム指示薬、例えばfura-2、fura-2-AM、indo-1、quin2、fluo-3、rhod-2などを用いることができるが、なかでもfura-2-AM (1-(2-(5'-カルボキシオキサゾール-2'-イル)-6-アミノベンゾフラン-5-オキシ)-2-(2'-アミノ-5'-メチルフェノキシ)-エタン-N,N,N',N'-テトラアセチックアシッドベ

ンタアセトキシメチルエステル、和光純薬（東京））を使用した蛍光強度法を用いることが好ましい（唐木、実験医学、7（6）、626（1989））。

例えば、 $1 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ のfura-2-AMを20～40分間ロードし、タイロード液（ 135 mM NaCl 、 5.6 mM KCl 、 1.2 mM MgSO_4 、 2.2 mM CaCl_2 、 10 mM グルコース、 20 mM HEPES （[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジン]エタンスルホン酸）/NaOH（pH 7.4））にて洗浄した後、細胞内カルシウム濃度の指標として 340 nm および 380 nm の蛍光強度の比を求める。これには、例えばカバーガラスを循環定温チャンバー付蛍光測定装置（ARGUS-50、浜松フォトニクス社、浜松）を用いることができる。

産業上の利用可能性

本発明により、従来の育毛剤よりも高い育毛効果を有する育毛剤を提供することが可能である。

特に、本発明の育毛剤は、例えば、ATP、ATP誘導体、アデノシン、アデノシン誘導体等を細胞から放出させて、ATP受容体及び／又はアデノシン受容体を刺激して、育毛効果を発揮するという新規な作用機構に基づいており、顕著な育毛効果を奏するものである。

なお、ATP受容体刺激作用を有する化合物を有効成分とする育毛剤では、当該化合物としてアデノシン-5'-ジリン酸誘導体又はアデノシン-5'-トリリン酸誘導体を用いた場合に、特に高い育毛効果を得ることができる。

また、本発明により、ABCトランスポーターへの刺激作用を介するプリン受容体刺激作用、すなわちATP受容体及び／又はアデノシン受容体刺激作用、により、育毛効果を発揮するという新規な作用機構を有する育毛作用物質のスクリーニングを、容易に行うことが可能である。

実施例

次に、製剤例及び試験例（実施例及び比較例）を挙げて本発明を更に詳細に説明する。

育毛剤

製剤例 1（外用ローション剤）：

（成分）	配合量(W/V%)
2-[p-(2-カルボキシエチル)フェニルエチルアミノ]	0.5
-5'-N-エチルカルボキサミドアデノシン	
プロピレングリコール	10.0
エタノール	50.0
精製水	全100 ml

上記成分を攪拌し、均一に溶解させ外用ローション剤を調製した。

製剤例 2（外用クリーム剤）：

（成分）	配合量(W/W%)
アデノシン	1.0
中鎖脂肪酸トリグリセリド	18.0
ミリスチン酸イソプロピル	1.0
2-ヘキシルドデカノール	4.0
ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノステアレート	5.0
ソルビタンモノステアレート	3.0
グリセリンモノステアレート	6.0
セタノール	1.0
ステアリルアルコール	2.0
プロピレングリコール	15.0
p-アミノ安息香酸メチル	0.05
p-アミノ安息香酸プロピル	0.05

精製水

全 1 0 0 g

上記成分について、乳化剤の通常の製法に準じて外用クリーム剤を調製した。

製剤例 3（外用ゲル剤）：

（成分）	配合量(W/W%)
N 6 - (L - 2 - フェニルイソプロピル) アデノシン	0 . 5
ポリエチレングリコール (1 0) モノステアレート	1 . 0
1 , 3 - ブチレングリコール	7 . 0
カルボキシビニルポリマー	1 . 5
ジイソプロパノールアミン	適量
エタノール	4 0 . 0
精製水	全 1 0 0 g

上記成分について、ゲル剤の通常の製法に準じて外用ゲル剤を調製した。

製剤例 4（エアゾール剤）：

（成分）	配合量(W/W%)
ピナシジル	0 . 1
ポリオキシエチレン (2 0) ソルビタンモノステアレート	1 . 0
グリセリン	3 . 0
エタノール	2 0 . 0
精製水	1 5 . 0
イソペンタン	1 0 . 0
液化石油ガス	3 . 0
ジメチルエーテル	4 8 . 0

上記成分について、エアゾール剤の通常の製法に準じて外用エアゾール剤を調製した。

試験例：

実施例 1 ～ 1 5（表 1 及び表 2）の育毛剤の発毛試験を C 3 H / H e N C r J

マウスを用い行った。試験法はマウスを1群10匹とし、実施例1～15、比較例1及び2、並びに、無投与群の17群に分け、マウスの背部をバリカンおよびカミソリにて剃毛し、それぞれのサンプルを1日1回、剃毛した背部8平方cm当たり100 μ Lずつ塗布した。実施例1～15、比較例1及び2の育毛剤は製剤例1と同様に、表1及び表2に示す各成分を全体が均一な状態となるまで攪拌して調製した。実施例1～15の育毛剤及び比較例1、2の育毛剤の投与群、並びに無投与群の塗布面積に対する毛の再生面積（15日後）を表3及び表4に示す。

表 1

成 分 名	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	実施例 5	実施例 6	実施例 7	比較例 1
化合物 1	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	
化合物 2								
化合物 3								
化合物 4								
化合物 5								
化合物 6								
化合物 7								
フタル酸ジエチル	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g
エタノール	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g
精製水	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL

化合物 1 : N6-シクロヘキシルアデノシン
化合物 2 : 2-クロロ-N6-シクロペンチルアデノシン
化合物 3 : 5'-N-エチルカルボキミドアデノシン
化合物 4 : アデノシン-5'-モノリン酸
化合物 5 : アデノシン-5'-モノリン酸メチルエステル
化合物 6 : N6-メチルアデノシン-5'-モノリン酸
化合物 7 : 8-ブチルアミノアデノシン

表 2

成分名	実施例 8	実施例 9	実施例 10	実施例 11	実施例 12	実施例 13	実施例 14	実施例 15	比較例 2
化合物 8	1 g								
化合物 9		1 g							
化合物 10			1 g						
化合物 11				1 g					
化合物 12					1 g				
化合物 13						1 g			
化合物 14							1 g		
化合物 15								1 g	
アデニル酸	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g
エタノール	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g
精製水	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL

化合物 8 : N6-シクロヘキシル-2'-O-メチルアデノシン

化合物 9 : R-フェニルイソプロピルアデノシン

化合物 10 : 2-[p-(2-カルボキシエチル)フェニルエチルアミノ]-5'-N-エチルカルボキサミドアデノシン

化合物 11 : 2-フェニルアミノアデノシン

化合物 12 : 2-クロロ-N6-(3-ヨードベンジル)アデノシン-5'-N-メチルウロナミド

化合物 13 : ジピリダモール

化合物 14 : エリスロ-9-(2-ハイドロキシ-3-ノニル)アデニン

化合物 15 : 2-オクチニルアデノシン

表 3

検 体 毛の 再生面積	実 施 例							比較例	無投与群
	1	2	3	4	5	6	7	1	
平 均 値 (%)	91.5	90.0	92.4	94.3	90.7	80.0	83.5	17.5	18.0

表 4

検 体 毛の 再生面積	実 施 例								比較例	無投与群
	8	9	10	11	12	13	14	15	2	
平 均 値 (%)	79.2	88.0	91.9	89.1	91.1	87.8	75.5	85.1	13.6	17.9

表 1 乃至表 4 の結果から明らかなように、本発明の育毛剤は毛の再生に関して高い効果を有する。

製剤例 5 (外用ローション剤) :

(成分)

α 、 β -メチレンアデノシン-5'-トリリン酸

配合量(W/V%)

0.5

プロピレングリコール	10.0
エタノール	50.0
精製水	全100 ml

上記成分を攪拌し、均一に溶解させ外用ローション剤を調製した。

製剤例6（外用クリーム剤）：

（成分）	配合量(W/W%)
2-メチルチオアデノシン-5'-トリリン酸	1.0
中鎖脂肪酸トリグリセリド	20.0
ミリスチン酸イソプロピル	1.0
2-ヘキシルドデカノール	4.0
ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノステアレート	5.0
ソルビタンモノステアレート	3.0
グリセリンモノステアレート	6.0
セタノール	1.0
ステアリルアルコール	2.0
プロピレングリコール	15.0
p-アミノ安息香酸メチル	0.05
p-アミノ安息香酸プロピル	0.05
精製水	全100 g

上記成分について、乳化剤の通常の製法に準じて外用クリーム剤を調製した。

製剤例7（外用ゲル剤）：

（成分）	配合量(W/W%)
2'-ベンゾイルアデノシン-5'-ジリン酸	5.0
ポリエチレングリコール（10）モノステアレート	1.0
1,3-ブチレングリコール	7.0
カルボキシビニルポリマー	1.5
ジイソプロパノールアミン	適量

エタノール	40.0
精製水	全100g

上記成分について、ゲル剤の通常の製法に準じて外用ゲル剤を調製した。

製剤例 8 (エアゾール剤) :

(成分)	配合量(W/W%)
3'-ベンゾイルアデノシン-5'-ジリン酸	0.1
ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノステアレート	1.0
グリセリン	3.0
エタノール	20.0
精製水	15.0
イソペンタン	10.0
液化石油ガス	3.0
ジメチルエーテル	48.0

上記成分について、エアゾール剤の通常の製法に準じて外用エアゾール剤を調製した。

製剤例 9 (外用ローション剤) :

(成分)	配合量(W/V%)
アデノシン-5'-トリリン酸メチル	0.01
プロピレングリコール	10.0
エタノール	50.0
精製水	全100 ml

試験例 :

実施例 16 ~ 22 (表 5) の育毛剤の発毛試験を C3H/HeNCrJ マウスを用いた。試験法はマウスを 1 群 10 匹とし、実施例 16 ~ 22 の育毛剤投与群、比較例 3 の育毛剤投与群及び無投与群の 9 群に分け、マウスの背部をバリカンおよびカミソリにて剃毛し、それぞれのサンプルを 1 日 1 回、剃毛した背部

8平方cm当たり100 μ Lずつ塗布した。実施例16～22及び比較例3の育毛剤は、製剤例5と同様に、表5に示す各成分を全体が均一な状態となるまで攪拌して調製した。実施例16～22の育毛剤及び比較例3の育毛剤の投与群並びに無投与群の塗布面積に対する毛の再生面積（15日後）を表6に示す。

表 5

成分名	実施例 16	実施例 17	実施例 18	実施例 19	実施例 20	実施例 21	実施例 22	比較例 3
化合物 16	1 g		1 g	1 g	1 g	1 g		
化合物 17		1 g						
化合物 18								
化合物 19								
化合物 20								
化合物 21								
化合物 22								
7°ピリジン								
エタノール								
精製水								

化合物 16 : α 、 β -メチレンアデノシン-5'-トリリン酸
 化合物 17 : 2-メチルチオアデノシン-5'-トリリン酸
 化合物 18 : 2'-ペンゾイルアデノシン-5'-トリリン酸
 化合物 19 : 3'-ペンゾイルアデノシン-5'-ジリン酸
 化合物 20 : アデノシン-5'-ジリン酸メチル
 化合物 21 : アデノシン-5'-ジリン酸
 化合物 22 : アデノシン-5'-トリリン酸

表 6

検 体 毛の 再生面積	実施例							比較例	無投与群
	1 6	1 7	1 8	1 9	2 0	2 1	2 2	3	
平 均 値 (%)	87.9	78.9	90.0	85.6	87.3	50.4	41.2	16.4	19.1

表 5 及び表 6 の結果から明らかなように、本発明の育毛剤は毛の再生に関して高い効果を有する。また、本発明の化合物群の中では、アデノシン-5'-ジリン酸（実施例 2 1）又はアデノシン-5'-トリリン酸（実施例 2 2）と比べて、それらの誘導体の方がより高い育毛効果を有することが明らかとなった。

製剤例 1 0（外用クリーム剤）

（成分）	配合量(W/W%)
クロマカリム	1. 0
中鎖脂肪酸トリグリセリド	18. 0
ミリスチン酸イソプロピル	1. 0
2-ヘキシルドデカノール	4. 0
ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノステアレート	5. 0
ソルビタンモノステアレート	3. 0
グリセリンモノステアレート	6. 0
セタノール	1. 0
ステアリルアルコール	2. 0
プロピレングリコール	15. 0

p-アミノ安息香酸メチル	0.05
p-アミノ安息香酸プロピル	0.05
精製水	全100g

上記成分について、乳化剤の製法に準じ、外用クリーム剤を調製した。

製剤例 1 1 (外用ゲル剤)

(成分)	配合量(W/W%)
MgATP	1.0
ポリエチレングリコール(10)モノステアレート	1.0
1,3-ブチレングリコール	7.0
カルボキシビニルポリマー	1.5
ジイソプロパノールアミン	適量
エタノール	40.0
精製水	全100g

上記成分について、ゲル剤の製法に準じ、外用ゲル剤を調製した。

製剤例 1 2 (エアゾール剤)

(成分)	配合量(W/W%)
オレオイル-COA	0.5
ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノステアレート	1.0
グリセリン	3.0
エタノール	20.0
精製水	15.0
イソペンタン	10.0
液化石油ガス	3.0
ジメチルエーテル	48.0

上記成分について、エアゾール剤の製法に準じ、外用エアゾール剤を調製した。

実施例 2 3 (外用ローション剤)

(成分)	配合量(W/V%)
ニコランジル	1.0
プロピレングリコール	20.0
エタノール	50.0
精製水	全100 ml

上記成分を攪拌し、均一に溶解させ外用ローション剤を調製した。

実施例 24-28

表7に示すように、実施例23におけるニコランジルを、ピナシジル（実施例24）、クロマカリム（実施例25）、MnATP（実施例26）、メグロチニド（実施例27）、L-アルギニン（実施例28）に代えた以外は実施例23と同様に外用ローション剤を調製した。

比較例 4

表7に示すように、実施例23におけるニコランジルを除いた以外は実施例23と同様に外用ローション剤を調製した。

表 7

成 分 名	実施例 2 3	実施例 2 4	実施例 2 5	実施例 2 6	実施例 2 7	実施例 2 8	比較例 4
化合物 2 3	1 g						
化合物 2 4		1 g					
化合物 2 5			1 g				
化合物 2 6				1 g			
化合物 2 7					1 g		
化合物 2 8						1 g	
アピロリン酸ナトリウム	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g	20 g
エタノール	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g	50 g
精製水	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL	全 100 mL

化合物 2 3 : ニコランジル
化合物 2 4 : ビナシジル
化合物 2 5 : クロマカリム
化合物 2 6 : MnATP
化合物 2 7 : メグロチニド
化合物 2 8 : L-アールギニン

試験例

実施例 23～28 と比較例 4 の外用ローション剤を用いた発毛試験を、C3H/HeNCrJマウスを用い、以下の通り行った。

試験法はマウスを 1 群 10 匹とし、試料投与群および無投与群の 8 群に分け、マウスの背部をバリカンおよびカミソリにて剃毛し、それぞれのサンプルを 1 日 1 回、剃毛した背部 8 平方 cm 当たり 100 μ L ずつ塗布した。実施例 23～28 の試料投与群、比較例 4 の試料投与群および無投与群の塗布面積に対する毛の再生面積（15 日後）を表 8 に示す。

表 8

検 体 毛の 再生面積	実施例						比較例	無投与群
	23	24	25	26	27	28	4	
平 均 値 (%)	81.4	87.5	88.8	78.4	94.4	80.4	16.0	13.9

上記試験例より、本発明の育毛剤は、毛の再生に関して、高い効果を持つことが確認された。

スクリーニング方法

<目的遺伝子の細胞への形質転換>

COS-1細胞（ 3×10^5 個 / 直径 35 mm シャーレ）を 10% 牛胎児血清を含んだダルベッコ変性 MEM 培地にて 5% CO₂ 雰囲気下、37℃で培養した。

別に、ヒトアデノシン受容体 cDNA（GenBank Accession No.X68485、参考文献：C.A.Kollias-Bakerら、The Journal of Pharmacology and Experimental Th

erapeutics, 281(2), 761-768 (1997)) とラットスルホニルウレア受容体 cDNA (GenBank Accession No. L40624、参考文献: Y. Tokuyama ら、Biochemical and Biophysical Research Communications, 220, 532-538 (1996)) を p cDNA 3. 1 ベクター (インビトロジェン社、カリフォルニア、米国) と p cDNA 3. 1 /Hygro ベクター (インビトロジェン社、カリフォルニア、米国) に常法に従ってそれぞれ導入し、p cDNA 3. 1 hAD および p cDNA 3. 1 /Hygro raSUR を得た。

p cDNA 3. 1 hAD は、p cDNA 3. 1 ベクターの EcoRI/NotI 部位に、ヒトアデノシン受容体 cDNA の HindIII/XbaI 断片 (1. 4 kb) が挿入されたものである。

p cDNA 3. 1 /Hygro raSUR は、p cDNA 3. 1 /Hygro ベクターの HindIII/XbaI 部位に、ラットスルホニルウレア受容体 cDNA の塩基番号 208-5086 の DNA 断片が挿入されたものである。

こうして得られた p cDNA 3. 1 hAD (1 μ g) および p cDNA 3. 1 /Hygro raSUR (1 μ g) を、先に培養しておいた COS-1 細胞中に、リポフェクタミンと Opti-MEM I 試薬、Nobuya Inagaki ら、Science, 270, 1166-1170 (1995) に記載された方法に準じて、トランスフェクトした。

その後、細胞をさらに培養し、コンフルエントに達したところでリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、0. 05% トリプシンと 0. 53 mM の EDTA 溶液で処理した。

ネオマイシンおよびハイグロマイシン耐性を指標にして高発現細胞株を得た。

スクリーニングには細胞をカバーガラス上で培養して供した。また、細胞内カルシウム濃度の測定には、FURA-2 を使用した蛍光強度法を用いた。すなわち 5 μ g/ml の fura-2 am を 30 分間ロードし、タイロード液にて洗浄した後、細胞内カルシウム濃度の指標として 340 nm および 380 nm の蛍光強度の比を求めた。

試験例

上記操作によって得られた細胞を用いて、以下の試験を行った。

試験例 1

スルホニルウレア受容体刺激剤として知られているニコランジルを用いて、本発明のスクリーニング法の有効性を確認した。その結果、図 2 に示す通り、ニコランジル 25、100 μ M 添加により細胞内カルシウム濃度が上昇するが、この作用はアデノシン受容体の阻害剤である 8-スルホフェニルテオフィリン 1 μ M の前処理により抑制されることが確認された。

試験例 2

アデノシン受容体刺激剤としてアデノシン 1.0 および 10.0 μ M を添加すると、図 3 に示す通り、細胞内カルシウム濃度は濃度依存的に上昇した。この作用はアデノシン受容体阻害剤である 8-スルホフェニルテオフィリン 1 μ M の前処理により抑制された。

試験例 1 および 2 の結果から、本発明の形質導入細胞では、スルホニルウレア受容体とアデノシン受容体が発現し、機能していることが確認できた。

なお、カルシウム除去培地ではニコランジルおよびアデノシンの作用は認められなかった。このことから、細胞内カルシウム濃度の増大は、細胞外カルシウムの流入によるものであることは明らかである。本発明で得られた形質転換細胞は、増殖能も良好で、育毛剤のスクリーニングに容易に使用することができる。

請求の範囲

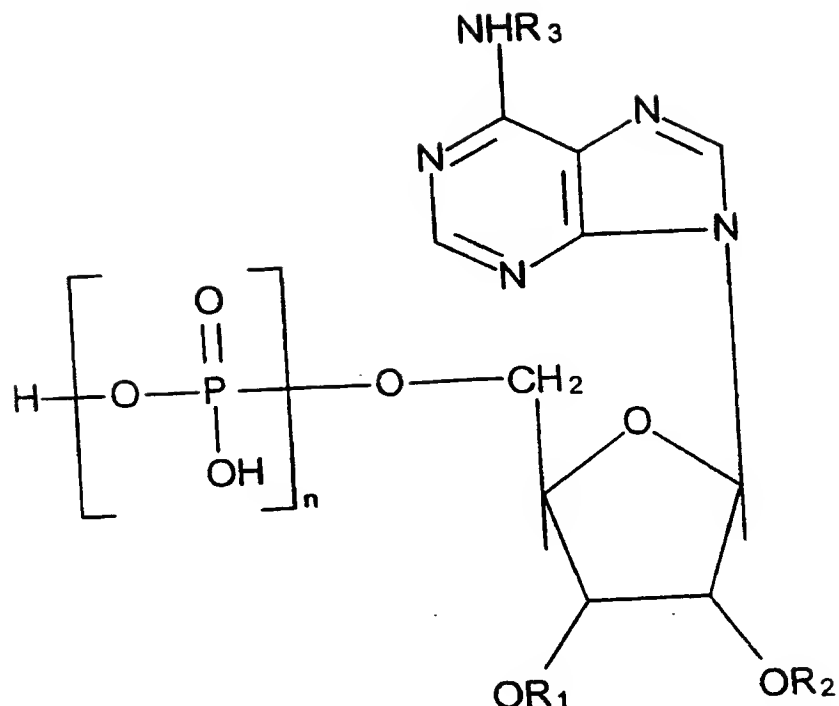
1. プリン受容体刺激作用を有する化合物、生体に適用後にプリン受容体刺激作用を有する化合物を遊離する化合物、若しくは、プリン受容体刺激作用を有する化合物の当該作用を増強する化合物の1種又は2種以上を有効成分として含有する育毛剤。

2. 前記プリン受容体刺激作用を有する化合物がアデノシン受容体刺激作用を有する化合物である請求項1記載の育毛剤。

3. アデノシン受容体刺激作用を有する前記化合物が、アデノシン、N6-シクロヘキシルアデノシン、N6-シクロベンチルアデノシン、(R)-N6-フェニルイソプロピルアデノシン、(S)-N6-フェニルイソプロピルアデノシン、(R)-フェニル-イソプロピルアデノシン、N-[R-(2-ベンゾチアゾリル)チオ-2-プロピル]-2-クロロアデノシン、2-クロロ-N6-シクロベンチルアデノシン、N6-[4-[[[4-[[[2-[[[(p-イソチオシアナトフェニル)アミノ]チオカルボニル]アミノ]エチル]アミノ]カルボニル]メチル]アミノカルボニル]メチル]フェニル]アデノシン、N6-[4-[[[4-[[[2-[[[(m-イソチオシアナトフェニル)アミノ]チオカルボニル]アミノ]エチル]アミノ]カルボニル]メチル]アミノカルボニル]メチル]フェニル]アデノシン、N-(メチル-フェネチル)アデノシン、ミノプリニル-デオキシ-N-エチルリボフラヌロアミド、5'-N-エチルカルボキサミドアデノシン、2-クロロアデノシン、N-エチル-1'-デオキシ-1'-[6-アミノ-2-[1-(3-ヒドロキシ-3-フェニル)プロピニル]-9H-プリン-9-イル]-β-D-リボフラン-5'-ウロナミド、N6-2-(4-アミノフェニル)エチルアデノシン、5'-N-シクロプロピルカルボキサミドアデノシン、N6-(p-スルホフェニル)アデノシン、1-デアザ-2-クロロ-N6-シクロベンチルアデノシン、8-ブチルアデノシン、1-シクロプロピルイソグアノシン、N6-シクロヘキシル-2'-O-メチルアデノシン、2-β-D-リボフラノシルオキサゾール

ー4ーカルボキサミド、2ーヨードーN6ーシクロペンチルアデノシン、N6ーシクロペンチルー2'ーメチルー2ークロロアデノシン、N6ーシクロヘキシルー2'ーOーメチルデノシン、2ー[Pー(2ーカルボキシエチル)フェニルエチルアミノ]ー5'ーNーエチルカルボキサミドアデノシン、2ー[(2ーアミノエチルアミノ)カルボニルエチルフェニルエチルアミノ]ー5'ーエチルカルボキサミドアデノシン、2ーヘキシニルー5ーメチルカルボキサミドアデノシン、2ーシクロヘキシルメチリデンヒドラジノアデノシン、Nーエチルカルボキサミドアデノシン、5'ー(Nーシクロプロピル)カルボキサミドアデノシン、Nー[2ー(3,5ージメトキシフェニル)フェニルエチル]アデノシン、Nー(2ーメチルベンジル)アデノシン、2ーオクチニルアデノシン、2ーフェニルアミノアデノシン、2ー[2ー(4ーフルオロフェニル)エトキシ]アデノシン、2ー[(シクロヘキシルメチレン)ヒドラジノ]アデノシン、2ークロローN6ー(3ーヨードベンジル)アデノシンー5'ーNーメチルウロナミド、N6ー(3ーイソチオシアナートベンジル)アデノシンー5'ーNーメチルウロナミド、2ークロローN6ー(3ーヨードベンジルアデノシンー5'ーNーメチルカルボキサミド、デフィプロチド(短鎖デオキシリボヌクレオチド)、ピナシジル、アデノシンー5'ーモノリン酸、アデノシンー5'ーモノリン酸メチルエステル、N6ーメチルアデノシンー5'ーモノリン酸、8ーブチルアミノアデノシン又はこれらの過ヨウ素酸酸化物である請求項2記載の育毛剤。

4. アデノシン受容体刺激作用を有する前記化合物又は生体に適用後にアデノシン受容体刺激作用を有する化合物を遊離する前記化合物が、式



[式中、 n は0または1、 $R_1 \sim R_2$ はそれぞれ水素原子または炭素原子数1～5のアシル基を示し、 R_3 は水素原子または保護基を示す。]で示される化合物である請求項2記載の育毛剤。

5. アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の当該作用を増強する前記化合物が、アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の取り込み阻害剤若しくはアデノシン受容体刺激作用を有する化合物の不活性化阻害剤である請求項2乃至4のいずれかに記載の育毛剤。

6. アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の前記取り込み阻害剤がジビリダモール、ジラセップ、リドフラジン、ヘキサベンジン、カルボクロメン、クロモナール酸、シネパジド、ジアゼパム、バパベリン、6-(2'-ヒドロキシニトロベンジル)チオグアノシン、プロベントフィリンである請求項5記載の育毛剤。

7. アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の前記不活性化阻害剤が、2'-

デオキシコホルマイシン、エリスロー９－（２－ヒドロキシ－３－ノニル）アデニンである請求項５記載の育毛剤。

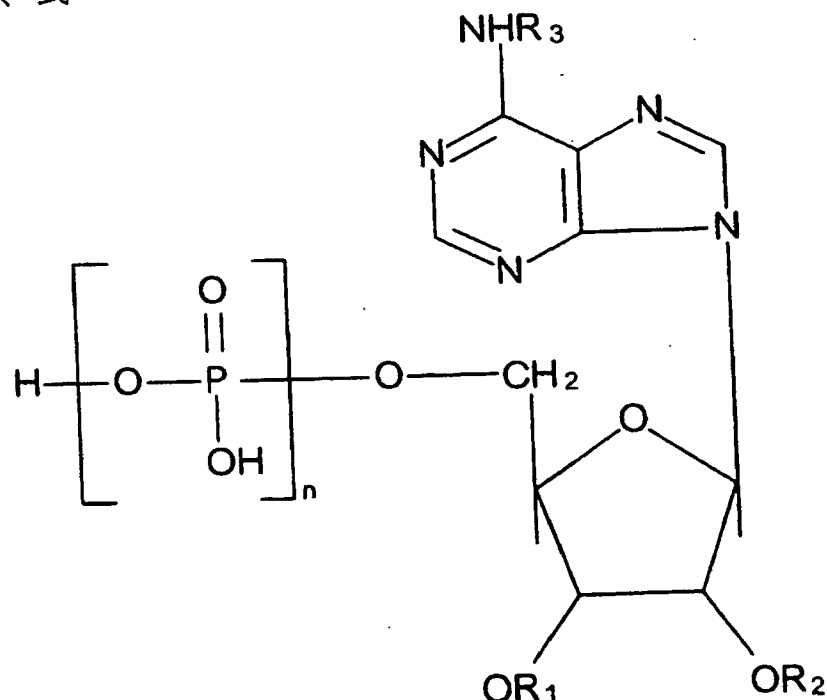
８．前記プリン受容体刺激作用を有する化合物がＡＴＰ受容体刺激作用を有する化合物である請求項１記載の育毛剤。

９．ＡＴＰ受容体刺激作用を有する前記化合物が、アデノシンジリン酸、アデノシントリリン酸又はこれらの誘導体である請求項８記載の育毛剤。

１０．ＡＴＰ受容体刺激作用を有する前記化合物が、アデノシン－５’－ジリン酸、アデノシン－５’－トリリン酸又はこれらの誘導体である請求項８記載の育毛剤。

１１．前記アデノシン－５’－ジリン酸誘導体又は前記アデノシン－５’－トリリン酸誘導体がエステル誘導体である請求項１０記載の育毛剤。

１２．前記アデノシン－５’－ジリン酸誘導体及び前記アデノシン－５’－トリリン酸誘導体が、式



[式中、 n は2または3、 $R_1 \sim R_2$ はそれぞれ水素原子または炭素原子数1～5のアシル基を示し、 R_3 は水素原子または保護基を示す。]で示される化合物である請求項10記載の育毛剤。

13. 前記アデノシン-5'-ジリン酸誘導体が、 α 、 β -メチレンアデノシン-5'-ジリン酸、2-メチルチオアデノシン-5'-ジリン酸、2'-ベンゾイルアデノシン-5'-ジリン酸、又は、3'-ベンゾイルアデノシン-5'-ジリン酸である請求項10記載の育毛剤。

14. 前記アデノシン-5'-トリリン酸誘導体が、 α 、 β -メチレンアデノシン-5'-トリリン酸、2-メチルチオアデノシン-5'-トリリン酸、2'-ベンゾイルアデノシン-5'-トリリン酸、又は、3'-ベンゾイルアデノシン-5'-トリリン酸である請求項10記載の育毛剤。

15. プリン受容体刺激作用を有する化合物を細胞から放出させる作用を有する化合物の1種又は2種以上を有効成分として含有する育毛剤。

16. プリン受容体刺激作用を有する前記化合物がATP、ATP誘導体またはATP代謝物である、請求項15記載の育毛剤。

17. プリン受容体刺激作用を有する前記化合物がアデノシン、アデノシン誘導体またはアデノシン代謝物である、請求項15記載の育毛剤。

18. 細胞から放出されるアデノシン誘導体またはアデノシン代謝物が、アデノシンモノホスフェート、アデノシンジホスフェートおよびアデノシントリホスフェートからなる群より選択される物質である請求項17記載の育毛剤。

19. プリン受容体刺激作用を有する化合物を細胞から放出させる作用を有する

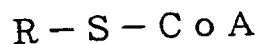
前記化合物が、細胞に存在するABCトランスポーターへの刺激作用を有する化合物である請求項15乃至18のいずれかに記載の育毛剤。

20. ABCトランスポーターへの刺激作用を有する化合物が、スルホニルウレア受容体への刺激作用を有する化合物である請求項19記載の育毛剤。

21. スルホニルウレア受容体への刺激作用を有する化合物が、メグリチニド、ニコランジル、レボクロマカリム、クロマカリム、ピナシジル、ジアソキサイド、ジソピラミド、チリソロール、アプリカム、ヒマカリム、MgATP、MnATP、CaATP、ZnATP、SrATP、MgADP、MnADP、CaADP、ZnADP、SrADP、MgAMP、MnAMP、CaAMP、ZnAMP、SrAMP、アデニル-5-イルイミドジホスフェート、L-リジン、L-アルギニンからなる群より選択される化合物である請求項20記載の育毛剤。

22. スルホニルウレア受容体への刺激作用を有する化合物が、カルシウム、マンガン、マグネシウム、亜鉛、およびストロンチウムからなる群より選択される二価陽イオンを含む塩である請求項20記載の育毛剤。

23. スルホニルウレア受容体への刺激作用を有する化合物が、下記式



[式中、Rは、分岐しても良い炭素数14～30のアシル基で、二重結合を0～3個含む]で示される長鎖アシルコエンザイムAである請求項20記載の育毛剤。

24. 外用剤である請求項1乃至23のいずれかに記載の育毛剤。

25. 前記有効成分の含有量が製剤全体の0.01～5重量%である請求項1乃至24のいずれかに記載の育毛剤。

26. ABCトランスポーター遺伝子とプリン誘導体に対する受容体遺伝子で形質転換させた細胞に対して被験物質を添加し、そのときの該細胞内へのカルシウム流入量を指標とすることを特徴とする、育毛作用を有する物質のスクリーニング方法。

27. ABCトランスポーター遺伝子がスルホニルウレア受容体遺伝子である請求項26記載のスクリーニング方法。

28. プリン誘導体に対する受容体遺伝子がアデノシン受容体遺伝子である請求項26または27記載のスクリーニング方法。

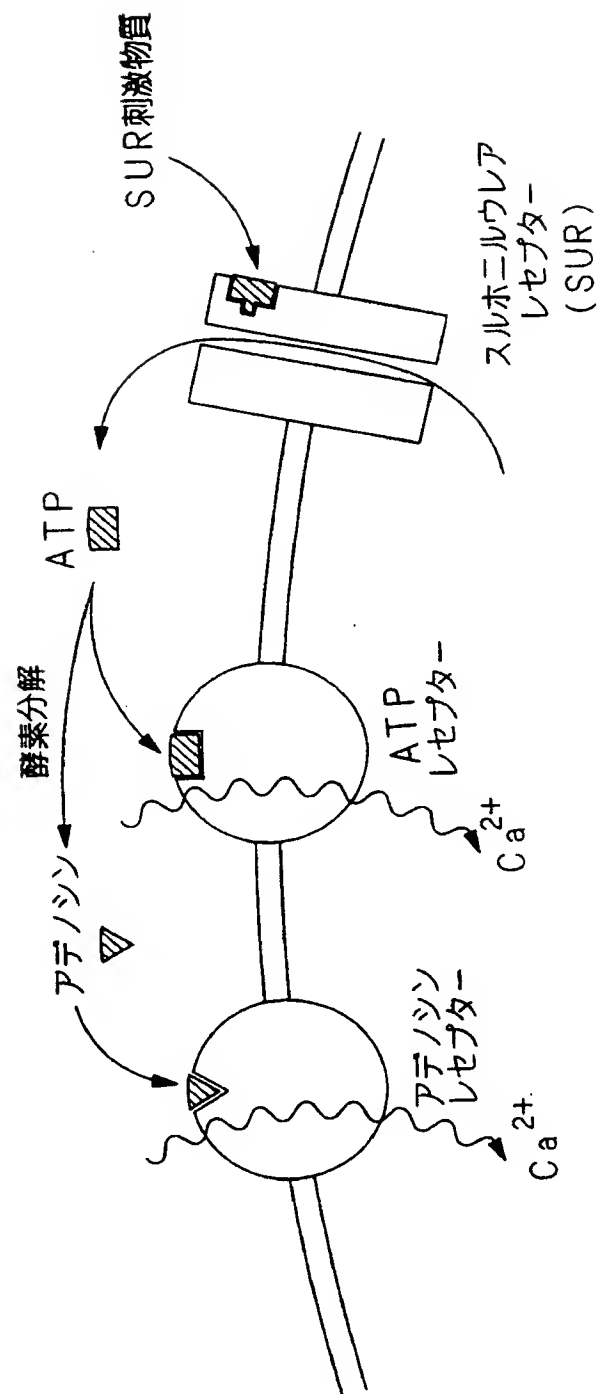
29. プリン誘導体に対する受容体遺伝子がATP受容体遺伝子である請求項26または27記載のスクリーニング方法。

30. 細胞内へのカルシウム流入量を、蛍光カルシウム指示薬を用いた蛍光強度で測定することを特徴とする請求項26から29のいずれかに記載のスクリーニング方法。

31. ABCトランスポーター遺伝子またはプリン誘導体に対する受容体遺伝子の形質転換を、宿主ベクター系による遺伝子組み換え技術によって行うことを特徴とする請求項26から30のいずれかに記載のスクリーニング方法。

1/2

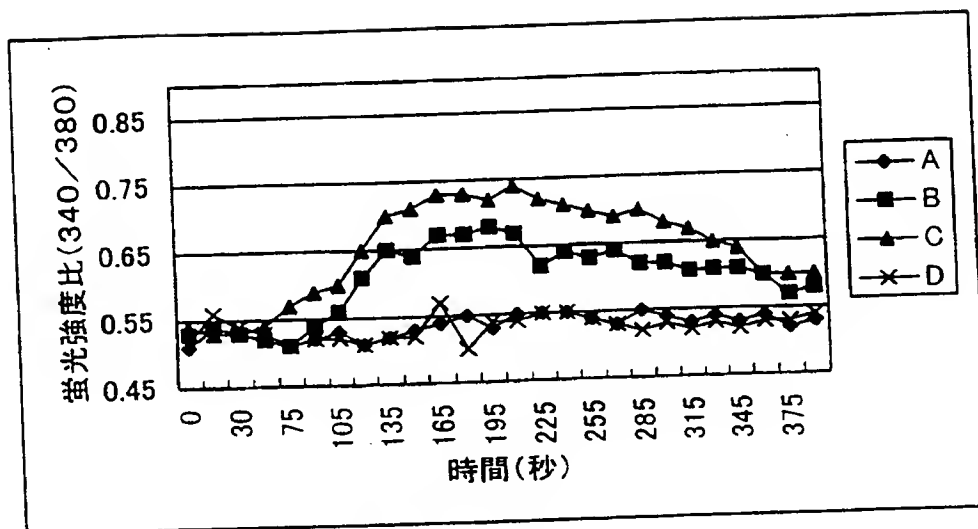
図 1



[細胞内]

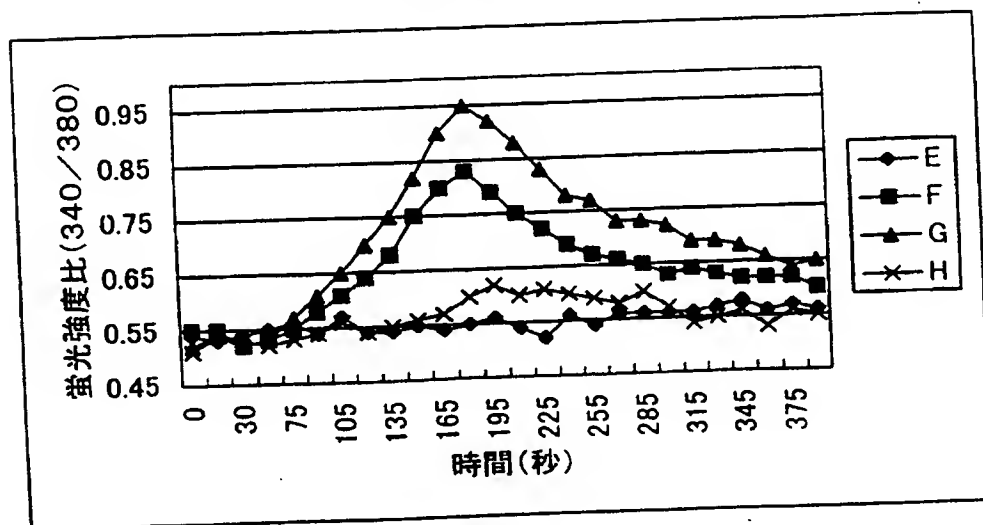
2/2

図 2



A:コントロール(薬物無添加)
B:ニコランジル(25 μ M添加)
C:ニコランジル(100 μ M添加)
D:Cに8-スルホフェニルテオフィリン1 μ M添加

図 3



E:コントロール(薬物無添加)
F:アデノシン(1 μ M添加)
G:アデノシン(10 μ M添加)
H:Gに8-スルホフェニルテオフィリン1 μ M添加

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00694

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A61K7/06, G01N33/50, C12Q1/02 // A61K45/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ A61K, G01N33, C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Leon L. Sun et al, "Cyclopentyladenosine improves cell pro-liferation, wound healing, and hair growth", Journal of Surgical Research, Vol.87, No.1, (1999.11), pp.14-24, the whole document; especially, abstract, page 19, left column, lines 18-38; page 19, right column, lines 3-47	1-7, 24, 25
X	DE, 4323616, A1 (Schreiner Edelgard), 19 January, 1995 (19.01.95), the whole document; especially, abstract; claims 2, 7 (Family: none)	1-14, 24, 25
X	EP, 540854, A2 (Sansho Seiyaku Co., Ltd), 12 May, 1993 (12.05.93), abstract; claims, pages 10, 14, line 30; page 17, line 20; page 18, lines 15 to 16; page 19, lines 17 to 18; page 20, lines 17 to 18; page 21, lines 17 to 18; page 25, line 13; page 26, line 13; page 29, lines 17 to 18; page 31, lines 13 to 14; page 33, lines 13 to 14 & JP, 5-320028, A & US, 565624, A & AU, 9222817, A & NO, 9203503, A & CA, 2077850, A	1-7, 24, 25

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 May, 2000 (16.05.00)

Date of mailing of the international search report
30 May, 2000 (30.05.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00694

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 2-311411, A (Kobayashi Kosei Co., Ltd.), 27 December, 1990 (27.12.90), the whole document; especially, claims (Family: none)	1, 8-14, 24, 25
X	JP, 1-42416, A (Hooou K.K.), 14 February, 1989 (14.02.89), the whole document; especially, claims (Family: none)	1, 8-14, 24, 25
X	JP, 10-203935, A (Sansho Seiyaku Co., Ltd.), 04 August, 1988 (04.08.88), abstract; claims (Family: none)	15-21, 24, 25
X	Charles S. Harmon et al., "Potassium channel openers stimulate DNA synthesis in mouse epidermal keratinocyte and whole hair follicle cultures", Skin Pharmacology, Vol.6, No.3, (1993), p.170-178, abstract	15-21, 24, 25
X	Allen E. Buhl et al., "Potassium channel conductance as a control mechanism in hair follicles", Journal of Investigative Dermatology, Vol.101, No.1, supplement, (1993), p.184S-152S, abstract	15-21, 24, 25
X	WO, 94/09750, A1 (Unilever N.V.), 11 May, 1994 (11.05.94), abstract; claims & JP, 8-502509, A & EP, 666729, A1 & AU, 9453426, A & ZA, 9308000, A & CN, 1091952, A	15-21, 24, 25
X	JP, 5-286834, A (Kanebo, LTD.), 02 November, 1993 (02.11.93), abstract; claims (Family: none)	15-21, 24, 25
Y	Nobuo Imura ed., "Receptor-kiso to rynsho-", 10 December, 1993 (10.12.93), Asakura shoten (Tokyo), pp.466-474	1-31
Y	Shinya Inagaki, et al., "Sulfonyl nyoso yudotai", Seikagaku, Vol.69, No.9, (1997), pp.1067-1080 (cited in the present specification)	15-31
Y	Katherine M. Bray et al., "A specific binding site for K ⁺ channel openers in rat aorta", The Journal of Biological Chemistry, Vol.267, No.17, (1992), pp.11689-11692, abstract (cited in the present specification)	15-31
Y	Fiona M. gribble, et al., "Mechanism of cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA", The Journal of Biological Chemistry, Vol.273, No.41, (1998), pp.26383-26387, abstract	23
Y	Robert Branstrom, et al., "Long chain coenzyme A esters activate the pore-forming subunit (Kir6.2) of the ATP-regulated potassium channel", The Journal of	23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00694

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Biological Chemistry, Vol.273, No.47, (1998), pp.31395-31400, abstract	
A	WO, 95/24885, A1 (Handeleman, joseph H.), 21 September, 1995 (21.09.95), abstract, claims & JP, 9-510448, A & US, 5455234, A & EP, 750489, A1 & CA, 2184173, A & AU, 9519844, A1 & AT, 173392, E & ES, 2123968, T3 & ZA, 9502098, A	1-7, 24-31
A	EP, 387757, A2 (Bioreserach S.p.A), 19 September, 1990 (19.09.90) & JP, 3-63225, A & CA, 2012045, A & AU, 9051273, A & ZA, 9001930, A	1-7, 24, 25
A	JP, 63-310813, A (Keikichi Sugiyama), 19 December, 1988 (19.12.88), Claims (Family: none)	5-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00694

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 1-20,22,24,25
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See extra sheet.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00694

Continuation of Box I.2 of continuation of first sheet (1)

Claims 1 to 20, 22, 24 and 25 pertain to parts of international application which does not satisfy definite requirements to such an extent as enabling the significant practice of the international search.

It is unclear how far the following compounds, among the active ingredients of hair stimulants as described in the above claims, involve particular compounds in the scope thereof.

"Compound having an effect of stimulating purine receptors", "compound liberating compound having an effect of stimulating purine receptors after application in vivo", and "compound potentiating an effect stimulating purine receptors of compound having this effect" as described in claim 1.

"Compound having an effect of stimulating adenosine receptor" as described in claim 2.

"Inhibitor of the uptake of compound having an effect of stimulating adenosine receptor" and "inhibitor of the inactivation of compound having an effect of stimulating adenosine receptor" as described in claim 5.

"Compound having an effect of stimulating ATP receptor" as described in claim 8.

"Compound having an effect of releasing compound having an effect of stimulating purine receptors from cells" as described in claim 15.

"Compound having an effect of stimulating ABC transporter" as described in claim 19.

"Compound having an effect of stimulating sulfonylurea receptor" as described in claim 20.

The international search cannot be completely made on hair growth stimulants containing as the active ingredient the compounds as described above, among hair growth stimulants as set forth in the above claims. Accordingly, the international search has been made exclusively based on compounds described in claims 3, 4, 6, 7, 9 to 14, 21 and 23 (Article 17(2)(a)(ii) of the PCT and Rule 33.3(b) of the Regulations under the PCT).

Continuation of Box II of continuation of first sheet (1)

It is recognized that the subject international application has eight inventions A to H as follows.

A. Among hair growth stimulants as set forth in claims 1 to 7, 24 and 25, those containing as the active ingredient "compound having an effect of stimulating adenosine receptor" or "compound liberating compound having an effect of stimulating adenosine receptor after application in vivo", and among screening methods as set forth in claims 26 to 31, those wherein the influx of calcium into cells is based on the expression of "adenosine receptor gene".

B. Among hair growth stimulants as set forth in claims 1, 8 to 14, 24 and 25, those containing as the active ingredient "compound having an effect of stimulating ATP receptor" or "compound liberating compound having an effect of stimulating ATP receptor after application in vivo", and among screening methods as set forth in claims 26 to 31, those wherein the influx of calcium into cells is based on the expression of "ATP receptor gene".

C. Among hair growth stimulants as set forth in claims 1 to 7, 24 and 25, those containing as the active ingredient "inhibitor of the uptake of compound having an effect of stimulating adenosine receptor".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00694

D. Among hair growth stimulants as set forth in claims 1 to 7, 24 and 25, those containing as the active ingredient "inhibitor of the inactivation of compound having an effect of stimulating adenosine receptor". E. Among hair growth stimulants as set forth in claims 1 to 4, 8 to 14, 24 and 25, those containing as the active ingredient "compound having an effect of potentiating an effect of stimulating purine receptors of compound having this effect" other than "inhibitor of the uptake of compound having an effect of stimulating adenosine receptor" or "inhibitor of the inactivation of compound having an effect of stimulating adenosine receptor".

F. Among hair growth stimulants as set forth in claims 15 to 19, 24 and 25, those containing as the active ingredient "compound having an effect of stimulating sulfonylurea receptor", and among hair growth stimulants as set forth in claims 20 to 23 and screening methods as set forth in claims 26 to 31, those wherein the influx of calcium into cells is based on the expression of "sulfonylurea receptor gene".

G. Among hair growth stimulants as set forth in claims 15 to 18, 24 and 25, those containing as the active ingredient "compound having an effect of stimulating ABC transporter" other than "compound having an effect of stimulating sulfonylurea receptor", and among hair growth stimulant as set forth in claim 19 and screening methods as set forth in claims 26 to 31, those wherein the influx of calcium into cells is based on the expression of "ABC transporter gene" other than "sulfonylurea receptor gene".

H. Among hair growth stimulants as set forth in claims 15 to 18, 24 and 25, those containing as the active ingredient "compound having an effect of releasing compound having an effect of stimulating purine receptors from cells" other than "compound having an effect of stimulating ABC transporter".

The above-described eight inventions A to H are respectively based on different function mechanisms. Such being the case, it does not appear that there is a technical relationship among these inventions involving the same or corresponding "special technical feature (technical feature clearly indicating contribution of the inventions as a whole to the prior art)". Thus, these inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept (Rules 13.2 and 13.3 of the Regulations under the PCT).

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K7/06, G01N33/50, C12Q1/02 // A61K45/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K, G01N33, C12Q

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Leon L. Sun et al, "Cyclopentyladenosine improves cell proliferation, wound healing, and hair growth", Journal of Surgical Research, Vol.87, No.1, (1999.11), pp.14-24, 文献全体、特に、要約, 第19頁左欄第18-38行, 第19頁右欄第3-47行	1-7, 24, 25
X	DE, 4323616, A1 (Schreiner Edelgard) 19.1月.1995(19.01.95), 文献全体, 特に、要約, クレーム2, 7 ファミリーなし	1-14, 24, 25

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.05.00

国際調査報告の発送日

30.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

井上 典之

4C

9360

電話番号 03-3581-1101 内線 3450

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	EP, 540854, A2 (Sansho Seiyaku Co., Ltd) 12. 5月. 1993 (12. 05. 93), 要約, クレーム, 第10頁, 第14頁第30行, 第17頁第20行, 第18頁第15-16行, 第19頁第17-18行, 第20頁第17- 18行, 第21頁第17-18行, 第25頁第13行, 第26頁第13行, 第29頁第 17-18行, 第31頁第13-14行, 第33頁第13-14行 & JP, 5-320028, A & US, 565624, A & AU, 9222817, A & NO, 9203503, A & CA, 2077850, A	1-7, 24, 25
X	JP, 2-311411, A (株式会社小林コーセイ) 27. 12月. 1990 (27. 12. 90), 文献全体, 特に、クレーム ファミリーなし	1, 8-14, 24, 25
X	JP, 1-42416, A (ホーユー株式会社) 14. 2月. 1989 (14. 02. 89), 文献全体, 特に、クレーム ファミリーなし	1, 8-14, 24, 25
X	JP, 10-203935, A (三省製薬株式会社) 4. 8月. 1988 (04. 08. 88), 要約, クレーム ファミリーなし	15-21, 24, 25
X	Charles S. Harmon et al, "Potassium channel openers stimu- late DNA synthesis in mouse epidermal keratinocyte and whole hair follicle cultures" Skin Pharmacology, Vol. 6, No. 3, (1993), p. 170-178, 要約	15-21, 24, 25
X	Allen E. Buhl et al, "Potassium channel conductance as a control mechanism in hair follicles" Journal of Investigative Dermatology, Vol. 101, No. 1, supple- ment, (1993), p. 184S-152S, 要約	15-21, 24, 25
X	WO, 94/09750, A1 (Unilever N.V.) 11. 5月. 1994 (11. 05. 94), 要約, クレーム & JP, 8-502509, A & EP, 666729, A1 & AU, 9453426, A & ZA, 9308000, A & CN, 1091952, A	15-21, 24, 25
X	JP, 5-286834, A (鐘紡株式会社) 2. 11月. 1993 (02. 11. 93), 要約, クレーム ファミリーなし	15-21, 24, 25
Y	井村裕夫編「レセプター基礎と臨床」10. 12月. 1993 (10. 12. 93) 朝倉書店(東京), p. 466-474	1-31
Y	稲垣暢也ら, "スルホニル尿素誘導体" 生化学, 第69巻, 第9号, (1997), p. 1067-1080 (この出願の明細書中で引用)	15-31

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Katharine M. Bray et al, "A specific binding site for K ⁺ channel openers in rat aorta" The Journal of Biological Chemistry, Vol.267, No.17, (1992), p.11689-11692, 要約 (この出願の明細書中で引用)	15-31
Y	Fiona M. Gribble et al, "Mechanism of cloned ATP-sensitive potassium channel activation by oleoyl-CoA" The Journal of Biological Chemistry, Vol.273, No.41, (1998), p.26383-26387, 要約	23
Y	Robert Branstrom et al, "Long chain coenzyme A esters activate the pore-forming subunit (Kir6.2) of the ATP-regulated potassium channel" The Journal of Biological Chemistry, Vol.273, No.47, (1998), p.31395-31400, 要約	23
A	WO, 95/24885, A1 (Handeleman, Joseph H.), 21.9月.1995(21.09.95), 要約, クレーム, & JP, 9-510448, A & US, 5455234, A & EP, 750489, A1 & CA, 2184173, A & AU, 9519844, A1 & AT, 173392, E & ES, 2123968, T3 & ZA, 9502098, A	1-7, 24-31
A	EP, 387757, A2 (Bioresearch S. p. A.) 19.9月.1990(19.09.90), 要約, クレーム & JP, 3-63225, A & CA, 2012045, A & AU, 9051273, A & ZA, 9001930, A	1-7, 24, 25
A	JP, 63-310813, A (杉山圭吉) 19.12月.1988(19.12.88), クレーム ファミリーなし	5-6

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☒ 請求の範囲 1-20, 22, 24, 25 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

(特別ページを参照。)
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(特別ページを参照。)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅱ欄の続き

この国際出願には、以下のA-Hの8つの発明があると認められる。

A. 請求の範囲1-7, 24, 25に記載の育毛剤のうち、有効成分が「アデノシン受容体刺激作用を有する化合物」又は「生体に適用後にアデノシン受容体刺激作用を有する化合物を遊離する化合物」であるもの、及び、請求の範囲26-31に記載のスクリーニング方法のうち、細胞内へのカルシウム流入が「アデノシン受容体遺伝子」の発現に基づくもの。

B. 請求の範囲1, 8-14, 24, 25に記載の育毛剤のうち、有効成分が「ATP受容体刺激作用を有する化合物」又は「生体に適用後にATP受容体刺激作用を有する化合物を遊離する化合物」であるもの、及び、請求の範囲26-31に記載のスクリーニング方法のうち、細胞内へのカルシウム流入が「ATP受容体遺伝子」の発現に基づくもの。

C. 請求の範囲1-7, 24, 25に記載の育毛剤のうち、有効成分が「アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の取り込み阻害剤」であるもの。

D. 請求の範囲1-7, 24, 25に記載の育毛剤のうち、有効成分が「アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の不活性化阻害剤」であるもの。

E. 請求の範囲1-4, 8-14, 24, 25に記載の育毛剤のうち、有効成分が「アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の取り込み阻害剤」又は「アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の不活性化阻害剤」以外の「プリン受容体刺激作用を有する化合物の当該作用を増強する化合物」であるもの。

F. 請求の範囲15-19, 24, 25に記載の育毛剤のうち、有効成分が「スルホニルウレア受容体への刺激作用を有する化合物」であるもの、請求の範囲20-23に記載の育毛剤、及び、請求の範囲26-31に記載のスクリーニング方法のうち、細胞内へのカルシウム流入が「スルホニルウレア受容体遺伝子」の発現に基づくもの。

G. 請求の範囲15-18, 24, 25に記載の育毛剤のうち、有効成分が「スルホニルウレア受容体への刺激作用を有する化合物」以外の「ABCトランスポーターへの刺激作用を有する化合物」であるもの、請求の範囲19に記載の育毛剤、及び、請求の範囲26-31に記載のスクリーニング方法のうち細胞内へのカルシウム流入が「スルホニルウレア受容体遺伝子」以外の「ABCトランスポーター遺伝子」の発現に基づくもの。

H. 請求の範囲15-18, 24, 25に記載の育毛剤のうち有効成分が「ABCトランスポーターへの刺激作用を有する化合物」以外の「プリン受容体刺激作用を有する化合物を細胞から放出させる作用を有する化合物」であるもの。

上記A-Hの8つの発明は、それぞれ異なる作用機序に基づくものであるから、同一又は対応する「特別な技術的特徴（各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴）」を含む技術的な関係があるとは認められず、単一の一般的発明概念を形成するように関連していると認められない。

(PCT規則13.2, 同規則13.3)

第 I 欄 2. の続き

請求の範囲 1-20, 22, 24, 25 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

上記各請求の範囲に記載の育毛剤の有効成分のうち、次のものが具体的にどのような化合物までをその範囲として包含しているのか不明瞭である。

- ・請求の範囲 1 に記載の「プリン受容体刺激作用を有する化合物」、「生体に適用後にプリン受容体刺激作用を有する化合物を遊離する化合物」及び「プリン受容体刺激作用を有する化合物の当該作用を増強する化合物」。
- ・請求の範囲 2 に記載の「アデノシン受容体刺激作用を有する化合物」。
- ・請求の範囲 5 に記載の「アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の取り込み阻害剤」及び「アデノシン受容体刺激作用を有する化合物の不活性化阻害剤」。
- ・請求の範囲 8 に記載の「ATP 受容体刺激作用を有する化合物」。
- ・請求の範囲 15 に記載の「プリン受容体刺激作用を有する化合物を細胞から放出させる作用を有する化合物」。
- ・請求の範囲 19 に記載の「ABC トランスポーターへの刺激作用を有する化合物」。
- ・請求の範囲 20 に記載の「スルホニルウレア受容体への刺激作用を有する化合物」。

なお、上記各請求の範囲に記載の育毛剤のうち有効成分が上記の化合物であるものについては、完全に国際調査を行うことができないため、請求の範囲 3, 4, 6, 7, 9-14, 21, 23 に記載の化合物に基づいて、国際調査を行った。

(PCT 第 17 条(2)(a)(ii), PCT 規則 33.3(b))